

U N I V E R S I T E R E N E D E S C A R T E S D E P A R I S

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MECANISMES
D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1971-1972

Série E N° 251

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES
MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Abbas A L D B A I S

Titre de la Thèse :

ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES DE L'ACTION DE DEUX HORMONES
REGULARISANT LE METABOLISME DU CALCIUM :
LA PARATHORMONE ET LA THYROCALCITONINE

Soutenue le : 22 MARS 1972

JURY : MM. R. PARIS

Y. RAOUL

J. C. GOUNELLE

Mme C. GULAT-MARNAY

Président

Examineurs

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MECANISMES
D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1971-1972

Série E N° 251

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES
MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Abbas A L D B A I S

Titre de la Thèse :

ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES DE L'ACTION DE DEUX HORMONES
REGULARISANT LE METABOLISME DU CALCIUM :
LA PARATHORMONE ET LA THYROCALCITONINE

Soutenue le : 22 MARS 1972

JURY : MM. R. PARIS

Y. RAOUL

J. C. GOUNELLE

Mme C. GULAT-MARNAY

Président

Examineurs

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY
HAS ACQUIRED THIS BOOK

DATE 1911-1912

1911-1912

1911-1912

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY
HAS ACQUIRED THIS BOOK

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY



THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

THE UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

A Monsieur le Professeur R.PARIS,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Qui nous a fait l'honneur de présider
notre Jury de thèse,

Qu'il agrée l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Y.RAOUL,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Qui nous a accueilli avec la plus grande
bienveillance dans son laboratoire et nous
a confié le sujet de notre thèse.

Grâce à ses conseils éclairés et à l'efficacité
des moyens qu'il a mis à notre disposition,
nous avons pu mener ce travail à son terme.

Qu'il veuille bien trouver ici nos remerciements
les plus respectueux et l'assurance de notre
entier dévouement.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547106_0010

A Monsieur le Professeur J.C.GOUNELLE,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Qui a bien voulu accepter de juger notre thèse,
et qui a, grâce à d'intéressantes discussions,
facilité une partie de notre travail statistique.

Avec l'expression de nos sentiments reconnaissants.

A Madame C.GULAT-MARNAY,

Maître de Recherche au Centre National de
la Recherche Scientifique,

Qui a eu l'obligeance de diriger notre travail,
nous a fait bénéficier de sa rigueur scientifique
et de sa grande expérience tout au long de nos
recherches, depuis l'initiation aux techniques
utilisées, jusqu'à la rédaction de notre thèse,

Nous tenons tout particulièrement à la remercier
ici et à lui exprimer notre plus profonde gratitude.

Qu'il nous soit permis de mentionner aussi :

La collaboration précieuse de Mademoiselle Nicole FOUQUIN,
Assistant à la Faculté de Pharmacie,
Qui a bien voulu réaliser pour nous des programmes
de statistiques,

et celle de Madame LABITTE, Ingénieur Chimiste du C.N.R.S.,
Qui nous a fait profiter de ses connaissances
scientifiques,

Qu'elles trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements

A Mesdames Marie-Paule TILLY et Marie-José BOUNIOL,

pour leur coopération efficace, nous leur adressons
nos remerciements.

A Madame DUVERNOY, qui a réalisé avec gentillesse la partie
matérielle de cette thèse, nous la remercions
vivement.

Nous ne saurions passer sous silence l'aide que nous ont
apportée nos collègues du laboratoire,

Nous sommes heureux de les remercier ici.

ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES

DE L'ACTION DE DEUX HORMONES REGULARISANT LE METABOLISME DU CALCIUM :

LA PARATHORMONE ET LA THYROCALCITONINE

S O M M A I R E

=====

INTRODUCTION : Contrôle endocrinien de la calcémie du rat et du poulet:
parathyroïdes, thyroïde , corps ultimobranchiaux.

TECHNIQUES GENERALES

1ère PARTIE : HORMONE PARATHYROIDIENNE

CHAPITRE I : Action hypercalcémiante de la parathormone chez le
Rat : importance du régime.

CHAPITRE II : Relations entre parathormone, vitamine D et calcium:
observations sur le Poulet.

CHAPITRE III : Aspects endocriniens de l'activité de la para-
thormone chez le Rat.

CHAPITRE IV : Dosages biologiques de la parathormone :
Rat, Poussin.

2ème PARTIE : THYROCALCITONINE

CHAPITRE I : Action de la thyrocalcitonine sur le Rat normal .

CHAPITRE II : Action de la thyrocalcitonine sur le Rat para-
thyroïdectomisé.

CHAPITRE III : Action de la thyrocalcitonine sur le Poulet.

CONCLUSIONS GENERALES

ANNEXES : I- Protocole de dosage de la parathormone sur le Rat et
sur le Poussin.

II- Protocole de dosage de la thyrocalcitonine sur le Rat.

I N T R O D U C T I O N

CONTROLE ENDOCRINIEN DE LA CALCEMIE

DU RAT ET DU POULET

PARATHYROÏDES, THYROÏDES, CORPS ULTIMOBRANCHIAUX

La capacité de régulation du calcium du milieu intérieur apparaît progressivement au cours de l'évolution des espèces. COPP (1969) a souligné que chez les invertébrés marins, la teneur en calcium des liquides circulants est presque identique à celle très élevée de l'eau de mer (de l'ordre de 40mg p.cent) tandis qu'elle décroît nettement chez les vertébrés marins.

Chez l'homme, la concentration de calcium dans le plasma est d'environ 10mg p.cent et ce chiffre demeure remarquablement constant bien que la calcémie soit la résultante d'un grand nombre de forces qui tendent à l'augmenter ou à la diminuer. La fluctuation du calcium sérique est de ± 3 p.cent (CARRUTHERS, 1964).

Chez les vertébrés supérieurs, la régulation du calcium est assurée principalement par l'action de deux tissus endocriniens :

- les parathyroïdes sécrétant la parathormone (PTH) hypercalcémiante et hypophosphatémiante,
- la thyroïde et les corps ultimobranchiaux sécrétant la calcitonine (TCT) hormone hypocalcémiante et hypophosphatémiante.

L'intervention de ces mécanismes régulateurs est très nettement mise en évidence par les expériences de SANDERSON, MARSHALL et WILSON (1960). Ils perfusent de jeunes chiens soit avec des sels de calcium, soit avec des chélateurs de cet élément (EDTA), pour augmenter ou diminuer la calcémie de ces animaux. La perfusion est pratiquée sur des chiens intacts ou thyroparathyroïdectomisés. Le rétablissement du taux de calcium sérique initial se fait en 3 à 4 heures chez les jeunes chiens non opérés, tandis que la calcémie des animaux opérés ne revient pas complètement au taux précédant la perfusion, même au bout de 24 heures. L'explication de ces différences frappantes, réside dans le fait que ces derniers ne possèdent ni parathormone, ni calcitonine. Normalement, c'est grâce à l'interaction de ces deux hormones que la concentration du calcium sérique reste constante (POTTS et coll., 1968 (a) CARE et coll., 1968). La parathormone est sécrétée en réponse à l'hypocalcémie; elle favorise la résorption de l'os d'où résulte une augmentation de la calcémie. La thyrocalcitonine est sécrétée sous l'effet de l'hypercalcémie et elle a pour premier rôle d'empêcher la résorption de l'os et par conséquent de diminuer le taux de calcium sérique.

Un autre facteur joue un rôle important dans l'homéostasie du calcium : c'est la vitamine D. Elle favorise l'absorption intestinale du calcium et agit directement sur la mobilisation minérale de l'os (DE LUCA, 1967). Il est à noter également que l'effet mobilisateur du calcium de la PTH dépend de la présence de vitamine D (HARRISON, HARRISON et PARK, 1958 - MARNAY et RAOUL, 1959 - RASMUSSEN et coll., 1963).

Les corticoïdes interviennent comme le montre la sur-rénalectomie dans le contrôle hormonal (P.T.H. et T.C.T.) du calcium (MARNAY-GULAT, NGHIEM et RAOUL, 1967 - CANAS et coll., 1967 - KAPLAN et coll., 1969 - TALMAGE et KENEDY, 1970 - TALMAGE, PARK et WEBSTER, 1970).

L'importance des différents facteurs hormonaux est variable selon les espèces et elle n'exclut pas le rôle de l'apport calcique alimentaire et des facteurs favorisant son absorption. Nous verrons que les conditions nutritionnelles sont importantes dans le cas de la parathormone et que les différences spécifiques sont marquées dans la sensibilité à la thyrocalcitonine. Ce sont donc ces points qui font particulièrement l'objet du présent travail.

HORMONE PARATHYROIDIENNE

La préparation initiale d'extraits parathyroïdiens actifs est très ancienne : HANSON (1923), COLLIP (1925). Ce n'est que trente ans plus tard que les techniques d'extraction ont permis d'obtenir des extraits hautement purifiés (AURBACH, 1959 - RASMUSSEN, CRAIG, 1959). La structure de la parathormone bovine a été déterminée en 1970 (NIALL et coll. - BREWER, RONAM), celle de la parathormone porcine est à l'étude (WOODHEAD et coll., 1971), celle de la parathormone humaine n'est pas encore connue. La synthèse d'un fragment de 34 acides aminés N-terminaux a été faite par POTTS et coll., 1971.

Le poids moléculaire de la parathormone est d'environ 9.500. Au cours de sa purification, l'activité biologique a été suivie à l'aide d'essais sur le rat parathyroïdectomisé basés sur l'activité hypercalcémiant (MUNSON, 1961).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de standard international d'activité de la parathormone. La plupart des chercheurs utilisent l'extrait commercial préparé par E. LILLY Co d'Indianapolis comme référence. Cet extrait est lui-même titré selon le procédé de COLLIP et CLARK (1925) sur le chien. L'unité USP est définie comme

le centième de la quantité nécessaire pour élever d'un milligramme pour cent la calcémie d'un chien de 10 à 12kg, 18 heures après injection sous-cutanée.

Le mécanisme d'action physiologique de la parathormone a fait l'objet de très nombreux travaux que l'on trouvera résumés dans des revues récentes : ARNAUD, TENENHOUSE, RASMUSSEN, 1967 - COPP, 1970 - TALMAGE et COOPER, 1970 - RASMUSSEN et TENENHOUSE, 1970 - MILHAUD, 1971).

Dès 1967, CHASE et AURBACH avaient observé que l'action de l'hormone parathyroïdienne s'accompagnait immédiatement d'un accroissement de l'excrétion d'acide 3'5'adénylique.

Les théories les plus récentes font donc intervenir la stimulation de l'adényl-cyclase par la parathormone au niveau de la membrane cellulaire (BORLE, 1971).

Nous avons essayé de préciser, dans ce travail, les réactions globales de l'animal à la parathormone exogène en fonction des apports calciques ou de leurs facteurs d'utilisation (vitamine D) et, par ailleurs, de l'équilibre endocrinien : parathyroïdes, thyroïde.

THYROCALCITONINE

La thyrocalcitonine (TCT), facteur hypocalcémiant et hypophosphatémiant extrait de la thyroïde, a été découverte en 1964 par HIRSCH et MUNSON après que COPP et CAMERON, 1961 - COPP et coll. (1962) eurent montré l'existence d'une hormone de ce type (calcitonine) dans le sang efférent thyro-parathyroïdien. Trois groupes de chercheurs travaillant de façon indépendante ont établi la structure de la thyrocalcitonine de porc en 1968 :

POTTS et coll. (1968b), NEHER et coll. et BELL et coll. C'est un polypeptide formé de 32 acides aminés dont le poids moléculaire est de l'ordre de 3.600. La même année, RITTEL et coll. et par la suite GUTTMANN et coll. ont synthétisé l'hormone suivant la structure déterminée auparavant.

Les corps ultimobranchiaux des oiseaux formés de cellules C sont riches en calcitonine. Malgré les différences importantes dans les séquences d'acides-amino suivant l'espèce : origine humaine, porcine, ovine, bovine et de saumon toutes les calcitonines étudiées sont actives sur le rat, ce dernier animal ayant servi de test pour suivre et titrer les préparations hormonales.

L'activité est généralement exprimée en unités M.R.C. (Medical Research Council), définies par l'essai d'un standard A préparé à partir de thyroïdes bovines, sur le rat. La baisse de calcémie provoquée par 10 mMRC serait de l'ordre de 10mg p. cent chez le rat Wistar de 120g (MILHAUD, MOUKHTAR, 1965).

L'effet principal de la calcitonine est son action sur l'os : elle inhibe le catabolisme osseux comme l'ont montré MILHAUD, PERAULT et MOUKHTAR (1965). Ce mode d'action a été confirmé *in vivo* et *in vitro*. L'action inhibitrice de la calcitonine sur la résorption des cultures de tissus osseux a été mise en évidence par différents groupes de chercheurs. Citons entre autres FRIEDMANN et RAISZ (1965), GAILLARD (1966), REYNOLDS et coll. (1968). La diminution de l'excrétion urinaire d'hydroxyproline sous l'influence de la calcitonine permet également d'évaluer le degré d'inhibition de la résorption osseuse (MARTIN, ROBINSON, Mc INTYRE, 1966). La calcitonine agit également au niveau du rein : elle provoque une augmentation de l'excrétion du calcium, du phosphate et du sodium (ARDAILLOU et coll., 1967). La complexité des effets au niveau subcellulaire est grande et une analyse des travaux récents a été faite par BORLE (1971). La calcitonine stimule en particulier le transport du calcium dans les mitochondries et favorise son incarcération à ce niveau.

Nous avons essayé de préciser, dans ce travail, les conditions générales d'action de la calcitonine sur le rat normal ou thyroparathyroïdectomisé, traité ou non par certains effecteurs (thyroxine ou vitamine D à dose pharmacologique) et vérifié l'inactivité de cette hormone sur le poulet.

T E C H N I Q U E S G E N E R A L E S

Nous résumerons brièvement les techniques générales (animaux, régimes, techniques opératoires, injections hormonales, prélèvement, dosage de Ca et de P sériques, calculs statistiques ...) utilisées au cours de notre expérimentation. Le protocole expérimental de chaque groupe de recherches sera décrit au début des expériences correspondantes.

ANIMAUX

Rats

a) au sevrage : 40/50g

Ces animaux proviennent de deux élevages différents :
Sprague Dawley (S.D.) et Wistar (W) = Evic-Ceba (Masson).
Sprague Dawley (S.D.) = Centre de recherches et élevage des Oncins
(IFFA).

b) Animaux jeunes en pleine croissance : 110/120g

Sprague Dawley (S.D.) ou Wistar (W) proviennent de Evic-Ceba (Masson)

Poulets

a) Poussins mâles d'un jour, souche Hubbard.

b) Poulets d'élevage âgés de 6 semaines achetés à la campagne,
chez des particuliers.

c) Poules pondeuses : C.N.R.Z., Gif sur Yvette .

Chiens

Animaux mâles adultes pesant de 9 à 15 kg, de provenances diverses.

REGIMES

- Rats - Ratigène, Alimentation Equilibrée, Commentry (03)
 - Aliments Causse, Biscuits Extralabo, Ste Colombe (77)
 - Régime de HARRISON et coll. (1958).
- Poulets - Régime A.O.A.C. (1945).
 - Aliment complet pour poules, U.A.R., Villemoisson/Orge (94).
 - SANDERS, Aliment composé vitaminé, Sté FRAB, Moulin de Bouray sur Juine (94).
- Chiens - Aliment composé complet chiens et chiots, U.A.R., Villemoisson sur Orge (94).

ANESTHESIE

Les rats sont anesthésiés par inhalation d'éther ou par un mélange éther-chloroforme dans la proportion de 9/1 vol.

TECHNIQUES OPERATOIRES

- Parathyroïdectomie par cautérisation .
 Thyroparathyroïdectomie par cautérisation .
 Thyroparathyroïdectomie par excision .

VOIES D'ADMINISTRATION DES PRODUITS

- Voie sous-cutanée - région dorsale de l'animal .
 Voie intraveineuse - veine latérale de la queue .

PRELEVEMENT SANGUIN

Nous avons utilisé différents modes de prélèvement :

- Ponction cardiaque (rats, poussins d'un jour et poulets)
- Section de la jugulaire (rats)
- Ponction de l'aorte abdominale (rats)
- Ponction veineuse :
 - veine saphène (chiens)
 - veine latérale de l'aile (pour les poules pondeuses)

DOSAGE DU CALCIUM ET DU PHOSPHORE

Sérum

a/ Calcium : Le dosage du calcium sérique a été réalisé à l'aide du spectrophotomètre de flamme d'absorption atomique (Perkin Elmer 303) sur 0,2ml de sérum en présence de 4,8ml de solution de chlorure de lanthane pour éviter l'interférence des phosphates (Rousselet, 1966).

Solution de chlorure de lanthane

Cl_3La , 5 H_2O	8,82g
HCl N	100 ml
H_2O distillée qsp.	500 ml

b/ Phosphate : MABRY et coll. (1966) ont adopté sur une chaîne automatique type Technicon, la technique de HURST (1964). L'emploi d'un système réducteur puissant : chlorure stanneux + sulfate d'hydrazine, permet d'opérer sur un volume de sérum de l'ordre de 70µl.

Os

Les os dégraissés au Soxhlet à l'alcool puis à l'éther, sont séchés et pesés, puis minéralisés au four durant 36h à une température inférieure à 600°. Ainsi nous déterminons le taux des cendres exprimé en pour cent du poids sec de l'os.

La dissolution d'une partie des cendres en présence d'acide chlorhydrique N permettra d'obtenir une solution servant au dosage du calcium suivant la technique décrite pour la calcémie.

ANALYSE STATISTIQUE

Toutes les données numériques sont exprimées par la moyenne des résultats avec l'erreur-type à la moyenne.

En cas d'étude de plusieurs doses d'hormone, nous utilisons une représentation semi-logarithmique: variation de la calcémie ou de la phosphatémie en fonction du logarithme de la concentration hormonale utilisée. La sensibilité est exprimée par la pente de la droite (b) ou coefficient de régression (PHILIPPE, 1967).

La précision de nos expériences est fonction de la dispersion des réponses et exprimée par l'écart-type S. La variance combinée S^2 est calculée selon le procédé du Codex 1965.

L'index de précision λ (GADDUM, 1953) :

$$\lambda = \frac{S}{b}$$

Les meilleures conditions sont celles où la pente est élevée et l'écart-type est faible, donc λ est petit.

- Dosage proprement dit d'un produit inconnu par rapport à un étalon

Essai factoriel (2,2)

Chaque titrage porte sur deux doses de l'étalon et deux doses du produit à titrer dans le rapport de 1 à 2 ou 1 à 3. Un groupe

témoin reçoit le solvant seul. Chaque groupe comprend un nombre identique d'animaux. L'analyse de la variance se fait soit selon la méthode de BLISS (1952), soit selon le Codex 1965. Le titrage est d'autant plus satisfaisant que les doses injectées de l'hormone étalon et de l'hormone inconnue seront d'activité voisine. Nous donnerons en annexe, un exemple de calcul détaillé selon la méthode préconisée par le Codex 1965.

PREMIERE PARTIE

H O R M O N E P A R A T H Y R O I D I E N N E

C H A P I T R E I

ACTION HYPERCALCEMIANTE DE LA PARATHORMONE CHEZ LE RAT :

IMPORTANCE DU REGIME

KENNY et MUNSON (1959) ont préconisé la suppression du calcium alimentaire, quatre jours avant la parathyroïdectomie pour accroître la sensibilité du rat à l'action hypercalcémiant de la parathormone. Nous examinons ici la réponse de rats parathyroïdectomisés par cautérisation à l'injection de parathormone en fonction du régime.

Nous allons comparer deux régimes préparés industriellement : "Ratigène" et "Aliment Causse" et des régimes semi-synthétiques préparés au laboratoire à teneur variable en calcium.

I- REGIMES INDUSTRIELS

Les deux formules utilisées sont à base de farines de blé et d'orge, de poisson, de levure; le Ratigène est présenté sous forme pulvérulente, l'Aliment Causse sous forme de bouchons cylindriques. Nous avons évalué les teneurs des éléments importants pour le métabolisme calcique : calcium, phosphore et vitamine D.

Teneur en calcium

La détermination du calcium après minéralisation à 600° est faite par la méthode de GAUTIER et PIGNARD (1953).

Ratigène Ca 1,14 p.100

Aliment Causse Ca 0,43 p.100

Ce dernier est presque trois fois moins riche en calcium que le Ratigène.

Teneur en vitamine D

Le dosage est fait par la méthode biologique de l'A.O.A.C.* (1945) basée sur la prévention du rachitisme du poulet et évaluée après trois semaines de régime rachitigène par l'indice de GUERILLOT-VINET : rapport des distances tarso-métatarsienne et tibio-métatarsienne mesurées sur les agrandissements des radiographies de l'articulation. Les animaux rachitiques ont un indice égal ou supérieur à 0,30. Les poulets guéris par 0,05µg de vitamine D₃ par jour ont un indice inférieur à 0,20 (PRELOT et coll., 1958).

Le tableau I résume les résultats obtenus : la teneur en vitamine D du Ratigène est légèrement supérieure à celle de l'Aliment Causse :

Ratigène Vit.D environ 2 UI/g

Aliment Causse Vit.D environ 1 UI/g

Le rapport P/Ca du Ratigène est voisin de 1,2.

* Association of Official Agricultural Chemists (Voir Official and Tentative Methods of Analysis).

TABLEAU I

Comparaison de l'activité vitaminique D
des régimes "Ratigène" et "Causse"

Substances essayées	Doses par jour et par poulet	Indice de rachitisme* de GUERILLOT-VINET après 21 jours
Témoins	0	0,36 $\pm$ 0,02 **
Vitamine D ₃	0,05 μ g	0,21 $\pm$ 0,01
Régime Causse	2 g	0,20 $\pm$ 0,01
Régime Ratigène	0,5 g	0,24 $\pm$ 0,01
" "	1 g	0,19 $\pm$ 0,01
" "	2 g	0,17 $\pm$ 0,01

* Cet indice est le rapport des distances tarse-métatarse et tibia-métatarse, il est $\geq 0,30$ pour les rachitiques et $\leq 0,20$ pour les normaux ou les guéris.

Ces chiffres varient, d'ailleurs, avec l'origine des poussins

** Moyenne de 6 poulets

II- REGIMES SEMI-SYNTHETIQUES

a) Régime sans calcium

Nous avons utilisé la formule de régime décrite par CAUSERET et HUGOT (1959) avec le mélange salin de HUBBELL, MENDEL et WAKEMAN (1937).

b) Régimes à teneur en calcium variable

Nous avons utilisé comme base un régime équilibré employé pour l'étude du métabolisme phosphocalcique du rat et décrit par HARRISON, HARRISON et PARK (1958). La levure de brasserie est remplacée par un mélange vitaminique complet (PANOS et coll., 1959). La vitamine A 350 UI et la vitamine D₃ 100 UI par rat et par semaine, sont administrées per os en deux fois en solution huileuse. L'eau de boisson est déminéralisée. Ce régime apporte 0,84 p.cent de calcium et 0,48 p.cent de phosphore, rapport Ca/P = 1,75.

Les régimes à teneur en calcium de 0,28, 0,56 ou 1,12 p.cent sont obtenus en modifiant le taux de chlorure et de carbonate de calcium du mélange salin, celui du phosphate reste constant.

Contrôle de l'activité hypercalcémiant de la parathormone

La parathyroïdectomie est faite par cautérisation sous anesthésie à l'éther-chloroforme, la calcémie est déterminée 6 heures après, puis 3 jours plus tard. La parathormone est administrée en deux injections espacées de 5 heures, la dernière 14 heures avant le contrôle de la calcémie. Chaque animal est ainsi son propre témoin.

Résultats

- Régimes industriels et régime sans calcium quatre jours avant la parathyroïdectomie

Nous comparons la réponse à la parathormone de groupes de rats recevant les régimes industriels (Ratigène et Aliment Causse) mis ou non au régime sans calcium 4 jours avant la parathyroïdectomie.

A l'âge de 5 à 6 semaines, les rats reçoivent pendant deux semaines les régimes industriels puis chaque groupe de 30 rats est divisé en deux lots : l'un continuant à recevoir le même aliment, l'autre le régime sans calcium indiqué ci-dessus.

Les tableaux II et III résument les données obtenues. Le régime sans calcium pendant 4 jours accroît l'hypocalcémie due à la parathyroïdectomie quel que soit le régime initial. De plus, avec le régime Causse, la calcémie des rats normaux est déjà abaissée de 10 p.cent après ce régime (Tableau II).

TABLEAU II

Comparaison des calcémies des rats
six heures après parathyroïdectomie (Px)
suivant le régime (Ratigène et Aliments Causse)
suivie d'une période de quatre jours sans calcium

Régimes	Ca sérique mg p.100ml	
	normaux	Px
<u>Ratigène</u> (Ca 1,14 p.100)	9,62 $\pm$ 0,09 (5)	7,84 $\pm$ 0,10 (12)
Sans Ca : 4 jours	9,61 $\pm$ 0,05 (3)	7,05 $\pm$ 0,19 [*] (9)
<u>Causse</u> (Ca 0,43 p.100)	10,02 $\pm$ 0,03 (5)	6,23 $\pm$ 0,20 (6)
Sans Ca : 4 jours	9,06 $\pm$ 0,02 (5)	5,45 $\pm$ 0,22 ^{**} (6)

* P < 0,01

par rapport aux rats Px au régime commercial.

** P < 0,05

() Nombre de rats

L'action hypercalcémiant de la parathormone s'observe avec les deux régimes commerciaux. L'ingestion du régime sans calcium 4 jours avant la parathyroïdectomie et 3 jours après celle-ci, réduit fortement l'action hypercalcémiant de la parathormone (Tableau III).

TABLEAU III

Variation de la calcémie
des rats 3 jours après Px
après injection de PTH, en fonction des régimes

Régimes	Calcémie mg p.100 après PTH		
	Unités USP par rat		
	0	100	200
<u>Ratigène</u>	7,70 $\pm$ 0,25 (4)	+ 1,29 $\pm$ 0,05 [*] (4)	+ 1,33 $\pm$ 0,12 [*] (5)
<u>Sans Ca</u> (4 + 3) jours	5,61 $\pm$ 0,28 (5)	+ 0,16 $\pm$ 0,06 $\cancel{\neq}$ (5)	+ 0,5 $\pm$ 0,06 $\cancel{\neq}$ (5)
<u>Causse</u>	6,47 $\pm$ 0,22 (5)	+ 1,20 $\pm$ 0,10 [*] (5)	
<u>Sans Ca</u> (4 + 3) jours	5,85 $\pm$ 0,25 (5)	+ 0,13 $\pm$ 0,05 $\cancel{\neq}$ (5)	

* P < 0,05

$\cancel{\neq}$ N.S.

() Nombre de rats

On constate une différence entre les deux régimes commerciaux utilisés : l'hypocalcémie 6 heures ou 3 jours après parathyroïdectomie est plus marquée chez les rats nourris au régime "Causse" que chez ceux recevant le "Ratigène". Le taux de calcium de ce dernier est d'environ trois fois supérieur au précédent et il est également plus riche en vitamine D. De même la disparition de l'activité hypercalcémiant de la parathormone sur les rats privés d'apport calcique pendant 7 jours, souligne l'importance des réserves de l'animal en calcium.

Nous avons cherché à réduire les variations de celles-ci en prenant les rats dès le sevrage et en leur administrant un régime semi-synthétique de composition définie particulièrement pour le calcium, le phosphore et la vitamine D.

Les rats Wistar mâles reçoivent au sevrage et pendant trois semaines, le régime à 0,84 p.cent de calcium puis ils sont parathyroïdectomisés (Px) dans les conditions précédemment décrites. Le tableau IV réunit les résultats obtenus. Les valeurs moyennes de la calcémie, 3 jours après la parathyroïdectomie sont inférieures à 7mg p.cent. L'hypercalcémie provoquée par l'injection de para-

TABLEAU IV

Variation de la calcémie après injection de PTH à des rats
au régime à 0,84 p.100 de Ca
(3 jours après Px)

Ca sérique initial mg p.100	Ca sérique mg p.100 18h après PTH		Variation de la calcémie
	50 USP	100 USP	
6,91 $\pm$ 0,22 (9)	9,05 $\pm$ 0,39		+2,14* $\pm$ 0,16
6,57 $\pm$ 0,15 (11)		9,44 $\pm$ 0,13	+2,87** $\pm$ 0,1

* $P < 0,01$

** $P < 0,001$

() Nombre de rats

thormone est très nette. On peut se demander si ce régime, arbitrairement choisi pour son équilibre calcium/phosphore permet néanmoins la réponse optimale à la parathormone. Dans ce but, nous avons fait varier le taux de calcium du régime sans modifier celui du phosphore ou de la vitamine D et nous avons comparé l'action hypercalcémiant de la parathormone.

Taux de calcium variable : 0,28 ; 0,56 ; 0,84 ; 1,12 p.100

Les rats au sevrage reçoivent des régimes à 0,28, 0,56, 0,84 ou 1,12 p.cent de calcium pendant 3 semaines, puis ils sont parathyroïdectomisés comme dans l'expérience précédente.

Le tableau V représente les calcémies des rats trois jours après parathyroïdectomie et les variations observées après injection de parathormone à la dose de 50 ou 100 USP ainsi que le taux de cendres et de calcium de l'os. La calcémie est pratiquement identique pour les animaux ayant reçu le régime à 0,28, 0,56 et 0,84 p.cent de calcium, mais au taux de 1,12 p.cent la calcémie 3 jours après parathyroïdectomie est significativement plus élevée. L'hypercalcémie provoquée par 50 USP de parathormone est plus faible sur les régimes à taux extrêmes de 0,28 et 1,12 p.cent de calcium que sur les régimes à taux moyens de 0,56 et 0,84 p.cent. Avec 100 USP les réponses sont d'intensité comparable aux divers régimes avec une légère tendance à l'atténuation au taux de 1,12 p.cent de calcium.

Régime sans calcium ($< 0,01$ p.100) pendant six semaines

La carence calcique prolongée malgré la présence de vitamine D conduit à une hypocalcémie importante, nous avons cherché à savoir si la parathormone exogène était susceptible de mobiliser le calcium de l'os et donc de normaliser la calcémie.

Les rats au sevrage ont reçu le régime sans calcium (moins de 0,01 p.cent) pendant 6 semaines, la croissance est très faible,

TABLEAU V

Variation de la calcémie mg p.cent à l'injection de PTH de rats, 3 jours après parathyroïdectomie (Px) en fonction du taux de calcium du régime et de la minéralisation de l'os

Ca régime %	Calcémie mg %	Variation de la calcémie après PTH Unités USP/rat		Minéralisation de l'os	
		50	100	Cendres%	Ca %
0,28	6,6 $\pm$ 0,4 (7)	+ 0,83 $\pm$ 0,17	+ 2,95 $\pm$ 0,15	62,7	38,4
0,56	6,62 $\pm$ 0,23 (14)	+ 2,14 $\pm$ 0,10	+ 3,18 $\pm$ 0,11	62,7	38,6
0,84	6,59 $\pm$ 0,25 (13)	+ 2,05 $\pm$ 0,22	+ 3,03 $\pm$ 0,11	62,5	38,6
1,12	8,17 $\pm$ 0,15 (8)	+ 0,68 $\pm$ 0,32	+ 2,55 $\pm$ 0,37	55,4	36,6

() Nombre de rats

certaines présentent des crises de tétanie. Après parathyroïdectomie les rats sont divisés en deux lots : l'un sert à la mesure de la calcémie, 6 heures après l'opération, l'autre reçoit à ce moment 100 USP de parathormone et 18 heures plus tard la calcémie est mesurée (Tableau VI). La calcémie des rats carencés en calcium pendant 6 semaines est très basse malgré l'apport de vitamine D₃ et avant même la parathyroïdectomie; 6 heures après cette inter-

vention le calcium sérique s'abaisse de façon non significative. La parathormone injectée, loin d'améliorer la calcémie de ces animaux, accroît encore l'hypocalcémie après 18 heures (baisse de 1,45mg p.cent). La composition minérale de l'os est très modifiée par ce régime : le taux de cendres est voisin de 38,5 p.cent au lieu de 62 p.cent chez des rats de même âge recevant un régime à 0,84 p.cent de calcium.

TABLEAU VI

Action de la parathyroïdectomie (Px) et de la parathormone (PTH) sur le calcium sérique de rats privés de calcium pendant 6 semaines

Traitement :	Non opérés	Px	Px + 100 USP PTH
Ca mg p.100	5,96 $\pm$ 0,19 (7)	$\not\neq$ 5,63 $\pm$ 0,25 (7)	*4,18 $\pm$ 0,05 (7)

* P < 0,05

$\not\neq$ N.S.

() Nombre de rats

Discussion

1) Les rats recevant le régime industriel à 0,43 p.cent de calcium (Aliment Causse) ou 1,14 p.cent (Ratigène) ont leur calcémie abaissée par la parathyroïdectomie et 100 USP de parathormone élèvent le taux de calcium sérique de 1,2mg p.cent environ.

La substitution à un régime industriel complet d'un régime semi-synthétique sans apport calcique entraîne en 4 jours une

légère hypocalcémie pour les animaux ayant reçu le régime le plus faible en calcium. La suppression de l'absorption intestinale du calcium par carence d'apport pendant 4 jours, malgré la présence de vitamine D est responsable d'une sensibilisation du rat à l'absence de parathormone endogène (parathyroïdectomie) se traduisant par une hypocalcémie plus grande conformément aux observations de KENNY et MUNSON (loc.cit.). La prolongation pendant 7 jours de cette carence calcique rend l'animal insensible aux effets de la parathormone exogène (100 USP).

2) Le régime semi-synthétique normocalcique (0,84 p.cent) ingéré par des rats au sevrage pendant 3 semaines, permet une croissance normale, l'hypocalcémie due à la parathyroïdectomie est nette et la variation provoquée par l'injection de 100 USP de parathormone est de 2,8mg p.cent. L'abaissement à 0,56 p.cent du taux de calcium du régime (Ca/P 1,16 au lieu de 1,75) ne modifie ni l'hypocalcémie, ni la réponse à la parathormone. Avec les régimes à 0,28 p.cent et 1,12 p.cent de calcium, 50 USP de parathormone ont une activité plus faible que celle observée avec les régimes à 0,56 et 0,84 p.cent. La minéralisation de l'os n'est modifiée cependant qu'au taux de 1,12 p.cent et, fait intéressant, malgré une calcémie plus élevée après parathyroïdectomie le taux de cendres est abaissé. Cette observation confirme les résultats de STEENBOCK et HERTING (1955) qui constatent une certaine diminution des cendres de l'os des rats recevant de la vitamine D et des régimes à apport Ca/P élevé, et également ceux obtenus par AYMARD (1970) sur des rats recevant un régime à 2,5 p.cent de calcium.

3) La prolongation d'une carence calcique pendant six semaines malgré l'apport de vitamine D conduit à une calcémie basse non modifiée par la parathyroïdectomie et même réduite après injection de parathormone. AYMARD (1970) a observé le même résultat en donnant simultanément vitamine D₃ et parathormone à des rats non

opérés, carencés en calcium. L'épuisement des réserves minérales et du calcium mobilisable de l'os peut, dans ce cas, être considéré comme responsable de l'inactivité de la parathormone.

En résumé, ces expériences soulignent l'importance de la teneur en calcium du régime alimentaire pour l'étude de l'action hypercalcémiante de la parathormone sur le rat.

C H A P I T R E I I

RELATIONS ENTRE PARATHORMONE, VITAMINE D ET CALCIUM :

OBSERVATIONS SUR LE POULET

Après avoir souligné l'importance de l'apport calcique global, il nous a paru intéressant d'étudier le rôle de la vitamine D indispensable à l'absorption intestinale du calcium et à sa fixation osseuse.

Dès 1930, MORGAN et GARRISON ont observé l'absence de toute action hypercalcémiante d'un extrait parathyroïdien sur le calcium sérique du chien carencé en vitamine D. HARRISON, HARRISON et PARK (1958) ont les premiers mis en évidence que le rat fortement rachitique, à calcémie basse ne présente pas d'hypercalcémie après injection de PTH. MARTIN (1958) à la suite d'études préliminaires est arrivé à la même conclusion. MARNAY et RAOUL (1959) ont confirmé le rôle indispensable de la vitamine D pour observer l'action hypercalcémiante de l'hormone parathyroïdienne sur le rat parathyroïdectomisé. RASMUSSEN et coll. (1963), démontrent que la calcémie faible des rats carencés en vitamine D, ne varie pas après la parathyroïdectomie ou l'injection de PTH et que la dose

de calciférol nécessaire pour restituer à l'hormone parathyroïdienne son action hypercalcémiant est très faible : 0,05 UI par jour pendant 6 jours, soit 0,0075 μ g.

La difficulté d'obtenir une carence totale en vitamine D pourrait expliquer d'après DE LUCA (1967), les résultats contradictoires rapportés dans la littérature indiquant que la vitamine D n'est pas indispensable à l'action de la parathormone, citons parmi ceux-ci TOVERUD (1964) sur le rat et de NICHOLS (1963) sur la souris.

Ceci nous a incité à choisir le poulet, plus facile à carencer en vitamine D que le rat, pour étudier les relations entre la vitamine D et la parathormone. De plus, cet animal répond même sans ablation des parathyroïdes à l'injection de PTH. En effet, l'activité hypercalcémiant de l'hormone parathyroïdienne de bovidés sur l'Oiseau a été signalée depuis longtemps, étudiée entre autres par POLIN (1957) qui préconise un délai de 3 à 4h pour observer le maximum de cette activité.

Activité de PTH sur les poulets normaux

Nous avons utilisé des poulets âgés de six semaines et mis à la diète hydrique la veille et pendant l'expérience. La calcémie est déterminée sur chaque animal avant et 3 h après l'injection sous-cutanée de 100 USP de PTH. L'augmentation du calcium sérique est de $1,98 \pm 0,20$ mg/100ml (moyenne sur 10 poulets) de même ordre que celle observée dans nos précédents essais sur le rat parathyroïdectomisé.

Action de PTH sur le poulet carencé ou non en vitamine D

Expérimentation

Des poussins mâles de souche Hubbard, juste éclos, sont gardés dans une pièce à l'abri de la lumière du jour et chauffés

avec une lampe à filament de carbone. Ils restent une journée sans nourriture avec eau à volonté et reçoivent ensuite le régime rachitigène de l'A.O.A.C. (1945) dont la composition est la suivante :

Semoule jaune de maïs	58 p.100
Caséine délipidée	12
Issues de blé	25
Levure de bière	2
Phosphate bicalcique	2
ClNa iodé (0,02% KI)	1

A chaque kg de régime, l'on ajoute 0,2g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

Ces poussins sont partagés en deux groupes. L'un reçoit 0,5 μg de vitamine D_3 dans 0,1 ml d'huile d'arachide neutralisée par jour, l'autre groupe reçoit 0,1 ml de la même huile neutralisée.

Résultats

La carence se manifeste par un retard de croissance, une calcémie basse, un indice de rachitisme élevé et après 3 semaines le taux de minéralisation de l'os est très abaissé. L'injection de 100 USP d'extrait parathyroïdien par poulet dans les conditions décrites précédemment ne provoque pas d'hypercalcémie, ni chez les poulets carencés, ni chez ceux recevant de la vitamine D (Tableau VII).

Or nous savons que la parathormone est active sur les poulets d'élevage dont le régime apporte 2,55 p.cent de calcium tandis que celui de l'A.O.A.C. n'en apporte que 0,6 p.cent.

Cette teneur en calcium considérée comme optimale pour le poulet (WALDROUP et coll., 1964) est peut-être insuffisante pour que se manifeste l'action de la PTH. En effet, nous avons observé précédemment qu'un apport calcique faible réduit ou annule l'effet hypercalcémiant de l'hormone parathyroïdienne sur le rat. Nous avons repris les expériences avec un régime enrichi en calcium.

TABLEAU VII

Influence du régime rachitigène de l'A.O.A.C. sur le poulet de trois semaines : réponse à 100 USP PTH (croissance, indice de rachitisme et minéralisation de l'os)

Vitamine D ₃	Ca mg p.100 ml sérum		Poids g	Indice de rachitisme*	Minéralisation du fémur	
	avant	après PTH			Cendres %	Ca%
0	7,23 $\pm$ 0,33 (8)	6,54 $\pm$ 0,25 (8)	126 $\pm$ 2 (13)	0,34 $\pm$ 0,01 (7)	34,1 $\pm$ 0,6 (5)	37
0,5µg/j	9,58 $\pm$ 0,27 (7)	9,69 $\pm$ 0,27 (7)	194 $\pm$ 3 (11)	0,16 $\pm$ 0,01 (7)	45,3 $\pm$ 0,5 (5)	38

() Nombre d'animaux

* Indice de GUERILLOT-VINET

Action de PTH sur le poulet carencé ou non en vitamine D, soumis au régime rachitigène enrichi en calcium

Des poussins mâles, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, reçoivent le régime rachitigène enrichi en calcium. Le supplément de calcium a été calculé pour avoir un taux de 1,86 p.cent; le taux de P est soit inchangé 0,68 p.cent (I), soit porté à 1,31 (II). Ces suppléments ont été ajoutés sous forme de mélange salin complexe 7,5 p.cent (formule de WESSON, 1932) pour le régime II, on élimine les phosphates pour le régime I.

L'examen du tableau VIII montre qu'avec ce taux de calcium l'action hypercalcémiante de PTH se manifeste uniquement sur les poulets recevant de la vitamine D₃. Le groupe II bien qu'ayant reçu un régime à Ca/P plus voisin de l'unité que le groupe I (Ca/P = 3) répond de façon voisine à l'injection de PTH.

TABLEAU VIII

Action de 100 USP de PTH sur la calcémie du poulet en fonction des taux de Ca, P et vitamine D du régime

Vitamine D	Régime %		Ca mg p.100 ml sérum	
	Ca	P	avant	après PTH
0	I 1,86	0,68	7,59 $\pm$ 0,30 (10)	7,08 $\pm$ 0,10 (10)
0,5 µg/j	"	"	10,69 $\pm$ 0,11 (15)	13,55 $\pm$ 0,10 (15)
0	II 1,86	1,31	7,46 $\pm$ 0,18 (12)	7,74 $\pm$ 0,12 (8)
0,5 µg/j	"	"	9,67 $\pm$ 0,1 (14)	11,99 $\pm$ 0,18 (7)

() Nombre d'animaux

Restauration de l'action hypercalcémiante de PTH chez le poulet carencé en vitamine D

Afin de préciser le mécanisme de l'action conjointe de la vitamine D et de la parathormone, nous avons étudié les délais

de réponse à l'hormone après ingestion de doses variables de vitamine D.

L'absorption du calcium au niveau intestinal sous l'influence de la vitamine D se fait après un temps de latence de quelques heures (WASSERMAN et coll., 1968). Le calcium sérique chez le rat carencé s'élève à partir de 8 heures après une dose très élevée de vitamine D₂ : 50.000 UI per os (HARRISON, 1966).

La réparation de l'os rachitique du poulet sous l'influence de la vitamine D a été étudiée par BELANGER et MIGICOVSKY, (1958). Ces auteurs administrent 5000 UI à 10.000 UI de D₃ à des poulets rachitiques de trois semaines : le début de minéralisation du cartilage épiphysaire n'apparaît qu'après 48 heures.

Nous avons cherché à quel moment : début d'élévation de la calcémie ou de la minéralisation, s'installait la réponse à PTH en fonction de la dose de D₃ 400 UI (10 µg) ou 10.000 UI (250 µg).

Protocole expérimental

Les poussins mâles Hubbard juste éclos restent une journée sans nourriture (eau à volonté) et reçoivent ensuite le régime rachitigène de l'A.O.A.C. (1945) supplémenté par 7,5 p.cent du mélange salin utilisé pour le rat, soit Ca 1,86 p.cent. Après trois semaines de régime on donne aux animaux carencés soit 10 µg de vitamine D₃ per os et on détermine le calcium sérique 3, 6, 18, 24, 28 et 96 heures après, soit 250 µg de D₃ et la calcémie est dosée 48 heures après.

Chaque groupe est divisé en deux : l'un recevant une injection de sérum physiologique et l'autre 100 USP de parathormone Lilly. Le calcium sérique est dosé 3 heures après ces injections. On vérifie, par ailleurs, l'activité de la parathormone sur les poulets ayant reçu la vitamine D₃ à la dose de 2 UI par jour pendant toute la durée de l'expérience et l'absence d'activité sur les animaux carencés.

Résultats

A partir de 18 heures après l'administration de 10 μg de vitamine D_3 , la calcémie des poulets augmente et se rapproche de la normale. Cependant, le délai de 48h est insuffisant pour que la PTH augmente le calcium du sang. Il faut attendre 96h pour restaurer l'action hypercalcémiante de l'extrait parathyroïdien. L'augmentation de la quantité de vitamine D_3 ingérée de 10 à 250 μg permet d'observer après 48 heures seulement, l'action normale de la parathormone (Tableau IX).

TABLEAU IX

Différence entre le temps nécessaire au rétablissement de la calcémie du poulet rachitique par la vitamine D_3 et celui de la restauration de l'activité hypercalcémiante de PTH (100 USP) (12 poulets par groupe).

Vitamine D ₃		Intervalle après D ₃ (heures)	Variation de la calcémie mg p.100ml	
μg			après D ₃	après PTH
Témoin	0	7,5 *		- 0,2
	0,05 x 21(jours)	10,2 *	<u>+ 2,7</u>	<u>+ 1,9</u>
Traitement	10	3	- 0,3	+ 0,8
	"	6	- 0,7	+ 0,3
	"	18	<u>+ 1,7</u>	<u>+ 0,6</u>
	"	24	<u>+ 1,5</u>	+ 0,5
	"	48	<u>+ 2</u>	+ 0,7
	"	96	<u>+ 1,3</u>	<u>+ 1,9</u>
	250	48	<u>+ 1,4</u>	<u>+ 1,9</u>

* calcémie initiale mg p.100 de sérum

————— P < 0,01

===== P < 0,001

par rapport au groupe témoin correspondant

Discussion

La sensibilité du poulet (élevé au régime standard) à l'action hypercalcémiant de la parathormone est du même ordre (2mg p.cent pour 100 USP) que celle du rat de 150g parathyroïdectomisé. Le taux de calcium du régime est un facteur important pour la mise en évidence de l'action hypercalcémiant, observation parallèle à celle que nous avons faite sur le rat. Le taux de 0,6 p.cent considéré comme normal par certains auteurs (WALDROUP et coll., loc.cit.) est insuffisant, il faut environ 1,8 p.cent de calcium dans le régime avec un taux de phosphates de 0,68 ou 1,3 p.cent.

La carence en vitamine D malgré le taux élevé de calcium alimentaire provoque une hypocalcémie et la parathormone est inactive. La vitamine D₃ à titre préventif (0,05µg/jour) empêche naturellement l'hypocalcémie et la parathormone à la dose de 100 USP provoque une hypercalcémie voisine de 2mg p.cent. La vitamine D₃ à titre curatif à la dose de 10µg/j accroit la calcémie des poulets rachitiques après 18 heures mais la parathormone ne peut agir qu'après 4 jours. A la dose de 250µg, ce délai est ramené à 2 jours. Ce temps de latence est plus long que celui observé chez le rat pour lequel l'injection soit simultanée de vitamine D₃ et de parathormone, soit de D₃ 18 heures avant, suffisent pour observer l'action hypercalcémiant de PTH (MARNAY et coll., 1964) (HARRISON, 1964). Il faut cependant souligner que la carence totale du rat en vitamine D est beaucoup plus difficile à obtenir. RASMUSSEN a montré que 0,05 UI pendant 6 jours suffisent c'est-à-dire environ 7/1000 de µg

La surface de l'os de l'animal carencé serait constituée par du tissu ostéoïde non minéralisé qui empêcherait le mouvement du calcium de la matrice osseuse vers le liquide intracellulaire (AU et RAIZ, 1967) et la modification de cette structure par la vitamine D demande une certaine latence. Après ingestion de 250µg de D₃ par le poulet rachitique, le remaniement du cartilage et le début de la minéralisation sont visibles en 48 heures (BELANGER et

MIGICOVSKY, loc.cit.), délai comparable à celui nécessaire pour observer l'action hypercalcémiant de PTH. Les résultats que nous avons obtenus sur le poulet s'accordent avec la notion d'une action directe de la parathormone sur le tissu osseux.

Une forme active de la vitamine D_3 a été isolée et étudiée au cours de ces dernières années: c'est le 25 hydroxycholecalciférol, il est plus actif sur la calcémie que la vitamine D_3 (DE LUCA, 1969).

Cependant HARRISON et HARRISON (1971) ont montré que sur le rat thyroparathyroïdectomisé une dose de 100 μ g de 25 hydroxycholecalciférol est moins active sur la calcémie que 100 μ g de dihydrotachystérol.

Un autre aspect du rôle métabolique de la vitamine D est son intervention au niveau de la synthèse protéique, en particulier dans la muqueuse intestinale. La protéine spécifique ainsi formée permettrait le transfert du calcium à travers les membranes biologiques (WASSERMAN et TAYLOR, 1963 et 1966). La durée de cette synthèse expliquerait le temps de latence observé entre l'ingestion de vitamine D et le passage du calcium dans le sérum, temps d'ailleurs réduit dans le cas du 25 hydroxycholecalciférol.

Les résultats que nous venons de rapporter, montrent que ce n'est pas cette action sur la synthèse protéique qui est immédiatement responsable de l'effet de la parathormone puisque le temps de latence est très supérieur.

Conclusion

Le taux de calcium et la teneur en vitamine D du régime sont deux facteurs importants pour observer l'action hypercalcémiant de la parathormone sur le poulet.

Chez l'animal rachitique traité par la vitamine D_3 la calcémie augmente dans un premier temps, mais l'action propre de la parathormone demande un délai qui est fonction de la dose de vitamine D_3 administrée.

C H A P I T R E I I I

ASPECTS ENDOCRINIENS DE L'ACTIVITE DE LA PARATHORMONE

CHEZ LE RAT

L'action de la parathormone sur le rat entier a été étudiée par BIERING (1950) : la sensibilité est faible, les doses utilisées sont de 150 à 1.000 USP par rat de 150g. Les variations de calcémie sont mesurées en 18 heures (+3mg p.cent avec 1.000 USP). La parathyroïdectomie rend le rat plus sensible à l'effet hypercalcémiant de la parathormone et la technique opératoire : excision chirurgicale, destruction par cautérisation ou thyroparathyroïdectomie, modifie à la fois le niveau calcique de base et l'hypercalcémie.

La comparaison systématique de la parathyroïdectomie par cautérisation ou par excision a conduit MUNSON et HIRSCH (1966) à mettre en évidence la libération de thyrocalcitonine chez le rat sous l'influence de la cautérisation.

Nous allons comparer diverses techniques opératoires sur deux souches de rats différentes, en prenant comme test la variation de calcémie provoquée par la parathormone.

EXPERIMENTATION

I- Race des animaux utilisés

Nous utilisons des rats blancs, mâles, au sevrage, soit de souche Sprague Dawley, généralement employée aux USA, soit Wistar, plus fréquemment employée en France. Les rats Sprague Dawley (SD) pèsent 50 à 55g et les Wistar (W) 40 à 45g. Ils reçoivent un régime normal.

II- Techniques chirurgicales

Les animaux sont mis à la diète hydrique quatorze à 16 heures avant l'opération, ils sont anesthésiés par inhalation du mélange éther-chloroforme 9 vol./1 vol.

Le rat anesthésié est fixé sur le dos sur une petite planchette. On fait après épilation et désinfection, une incision longitudinale médiane de la peau au niveau du sternum céphalique. On écarte les volumineuses glandes salivaires et on dégage bien le muscle sterno-mastoïdien. On aperçoit le muscle sterno-hyoïdien que l'on écarte à l'aide de pinces fines. La trachée est mise à nu, les muscles et la peau à ce niveau sont maintenus par des pinces à compresses. Sous un microscope binoculaire à dissection on écarte le muscle sternothyroïdien qui longe chaque lobe thyroïdien et ainsi on dégage les parathyroïdes. Ce sont de petites glandes rondes, de couleur plus claire que la thyroïde, situées à la partie arrière supérieure latérale de chaque lobe (Figure 1)

Parathyroïdectomie par cautérisation

A l'aide d'une pointe fine d'électrocautère, on détruit bilatéralement les parathyroïdes et environ le tiers de la thyroïde.

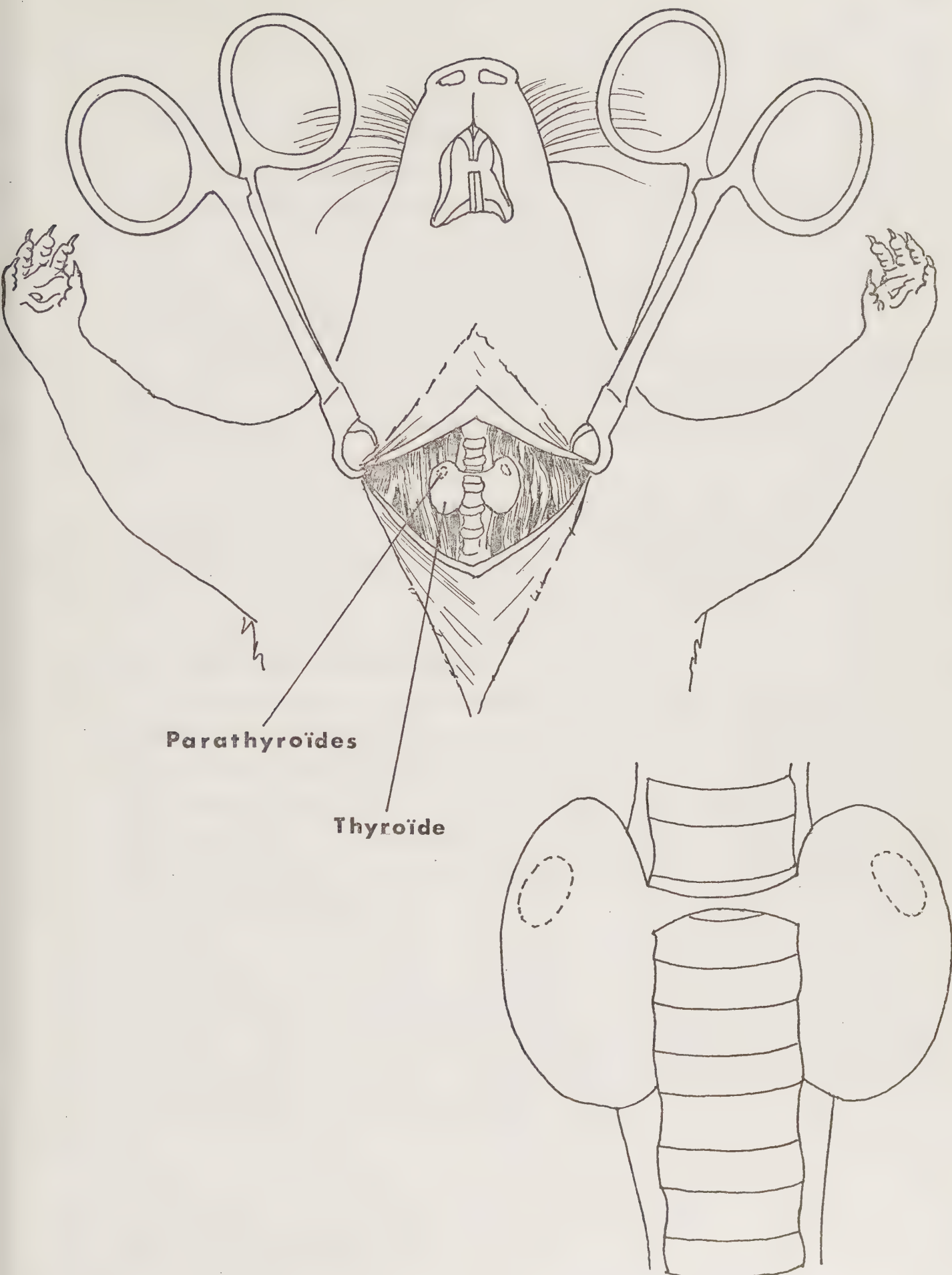


Figure 1 - Schéma anatomique de la thyroïde et des parathyroïdes.

N.B. : Les parathyroïdes se situent sur la face postérieure du pôle supérieur de la thyroïde.

Thyroparathyroïdectomie par cautérisation

A l'aide d'une pointe fine d'électrocautère, on détruit bilatéralement les parathyroïdes et la totalité du tissu thyroïdien.

Thyroparathyroïdectomie par excision

L'ensemble de l'appareil thyroparathyroïdien est soigneusement séparé à la pince et excisé. Il n'est pas nécessaire de faire une ligature ni une cautérisation des artères thyroïdiennes chez les rats au sevrage.

Après avoir nettoyé le champ opératoire, on le désinfecte au Sulfanilamide (*), on rapproche les deux lèvres du muscle et de la peau et on ferme l'incision par des agrafes.

III- Injection et prélèvement

L'injection de la parathormone ou de sérum physiologique (0,25ml par ml) est faite par voie sous-cutanée aussitôt après l'opération, sauf indication particulière. Le prélèvement sanguin est effectué six heures plus tard, après anesthésie légère, soit par section de la jugulaire, soit par ponction cardiaque. Le sang après coagulation spontanée est centrifugé, le sérum conservé au maximum 48h à +4°C.

IV- Etude statistique des résultats

Nous utilisons une représentation semi-logarithmique. La calcémie est exprimée en fonction du log de 2, 3 ou 4 concentrations, 2,5, 5, 10 et 20 USP de PTH injectées.

* marque "Exoseptoplix"

RESULTATS

I- RATS SPRAGUE DAWLEY

1) Parathyroïdectomie par cautérisation

a- Injection immédiate de PTH, activité en 6 heures

Nous avons pris deux lots de rats, chacun est divisé en quatre groupes. Aussitôt après la parathyroïdectomie, nous avons injecté du sérum physiologique au premier groupe qui servira de témoin et aux autres groupes 2,5 , 5 , 10 USP de PTH par rat. Six heures après nous pratiquons la prise de sang par la jugulaire sur chaque rat et on dose la calcémie (Tableau X).

Nous obtenons une courbe linéaire entre 2,5 et 10 USP (Figure 2). Les pentes (b) et les index de précision (λ) sont les suivants :

	<u>b</u>	<u>λ</u>
Série 1	5,33	0,24
Série 2	4,10	0,24

L'index de précision λ obtenu sur le rat au sevrage est voisin de celui de MUNSON avec le rat plus âgé (0,27).

La sensibilité de ces animaux permet d'utiliser une faible quantité de produit 2,5 à 10 USP par rat au sevrage, or le test de MUNSON demande 5 à 20 USP/100g d'animal, soit 7,5 à 30 USP par rat, c'est-à-dire trois fois plus. L'augmentation du calcium après l'administration de 10 USP par rat est : série 1 : 3,9mg p. cent ; série 2 : 4,4mg p. cent.

La calcémie des rats non opérés est de $9,5 \pm 0,08\text{mg}/100\text{ml}$ et ainsi nous arrivons à ramener la calcémie des rats opérés au taux normal et même dans la série 2 nous dépassons ce taux (Tableau X).

Cette sensibilité importante est obtenue sans soumettre les animaux à un régime spécial pauvre en calcium.

TABLEAU X

Activité de l'hormone parathyroïdienne Lilly, lot n°9 JA 73
 Sur la calcémie des rats (SD) 6 heures après parathyroïdectomie
 par cautérisation

Calcémie mg p.100 après PTH				Unités USP par rat	
0				5	10
Série 1	5,4	6,7	5,6	8,2	
	5,4	6,9	6,5	7,6	
	5,0	7,1	10,0	12,1	
	6,2	6,6	6,1	7,9	
	5,9	6,6	8,2	7,9	
	5,6	5,4	8,4	8,5	
	5,6	6,0	9,6	11,2	
	6,1	5,4	9,2	11,0	
	5,4	6,1	8,1	9,2	
		6,2	7,1	11,4	
Moyenne	$5,6 \pm 0,13$	$6,3 \pm 0,18$	$7,8 \pm 0,47$	$9,5 \pm 0,54$	
Série 2					
Moyenne	$6,2 \pm 0,45$	$7,9 \pm 0,35$	$9,1 \pm 0,53$	$10,6 \pm 0,27$	
Nbre d'animaux	(5)	(7)	(6)	(6)	

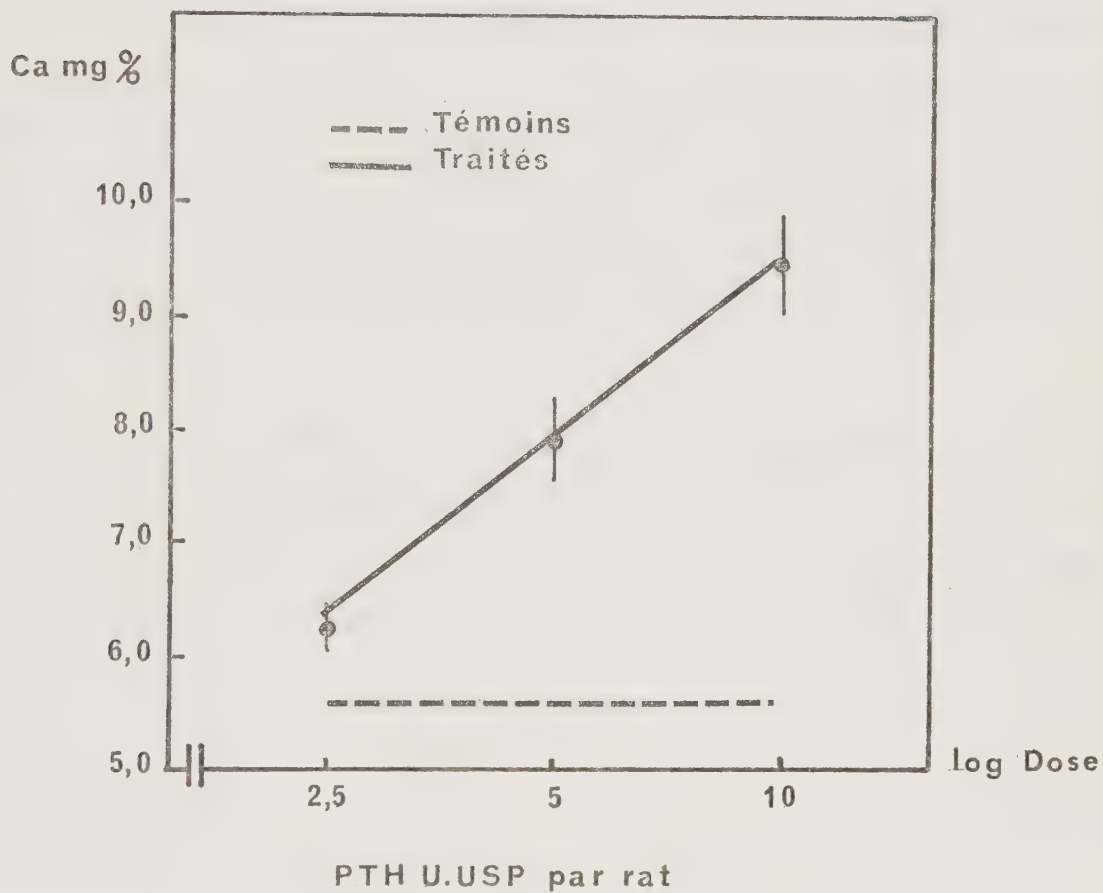


Figure 2 -- Variation (log-dose) de la calcémie du rat (SD) parathyroïdectomisé par cautérisation 6h après injection de PTH.

(ϕ erreur-type à la moyenne sur 10 animaux)

b- Injection de l'hormone parathyroïdienne quelques jours après : activité en 6 heures

L'animal n'est pas son propre témoin car nous avons constaté une hypocalcémie significative au niveau $P < 0,01$ entre la calcémie avant et 6 heures après l'injection de 0,5ml de sérum physiologique chez le rat pesant 150g. A fortiori, les rats au sevrage accuseraient une baisse plus importante entre ces deux prélèvements.

Nous avons pris un lot de 34 rats parathyroïdectomisés par cautérisation maintenus au régime standard pendant 3 à 4 jours : un groupe de ces rats reçoit du sérum physiologique et servira de témoin. Les autres groupes reçoivent respectivement 2,5, 5 et 10 USP par rat; six heures après on dose la calcémie de ces rats (Tableau XI).

Pente	$b = 2,81$
Index de précision	$\lambda = 0,32$

Le maximum de sensibilité est 2,4mg de calcium pour 100ml de sérum. Cette augmentation est obtenue avec 5 USP par rat.

TABLEAU XI

Activité en 6h de l'hormone parathyroïdienne Lilly, lot n°97 A 73 sur la calcémie des rats (SD), 3 jours après parathyroïdectomie par cautérisation (Px)

Calcémie mg p.100 après PTH Unités USP par rat			
0	2,5	5	10
$5,3 \pm 0,66$ (9)*	$6,3 \pm 0,34$ (9)	$7,7 \pm 0,29$ (8)	$7,9 \pm 0,12$ (8)

* () Nombre d'animaux

Nous constatons que cette méthode est plus sensible et plus précise avec des rats au sevrage qu'avec des rats de 6 à 7 semaines. Nous n'arrivons pas, même avec 10 USP, à ramener le taux de calcium sérique à celui des rats non opérés.

2) Thyroparathyroïdectomie par cautérisation. Injection immédiate de PTH, activité en 6 heures

Nous avons pratiqué la thyroparathyroïdectomie par cautérisation sur un lot de 40 rats divisé en 5 groupes dont l'un reçoit du sérum physiologique et servira de témoin et les autres reçoivent 2,5, 5, 10 et 20 unités USP par rat (Tableau XII).

Pente	$b = 2,83$
Index de précision	$\lambda = 0,59$

Nous constatons une variabilité importante dans chaque groupe et la calcémie moyenne des témoins thyroparathyroïdectomisés est supérieure à celle des rats parathyroïdectomisés par cautérisation.

10 USP de PTH par rat provoquent une hypercalcémie de 2,4mg p.cent.

TABLEAU XII

Activité de l'hormone parathyroïdienne Lilly, lot n°IVX 63 A
sur la calcémie des rats (SD) 6 heures
après thyroparathyroïdectomie par cautérisation

Calcémie mg p.100 après PTH Unités USP par rat				
0	2,5	5	10	20
$7,4 \pm 0,26$ (8)	$8,6 \pm 0,46$ (8)	$9,0 \pm 0,75$ (8)	$9,8 \pm 0,58$ (8)	$11,2 \pm 0,52$ (8)

() Nombre d'animaux

3) Thyroparathyroïdectomie par excision. Injection immédiate de PTH, action en 6 heures

Nous avons pratiqué la thyroparathyroïdectomie par excision et administré la PTH à un lot de 40 rats dans les mêmes conditions que précédemment (Tableau XIII). Nous obtenons :

$$\begin{array}{ll} \text{Pente} & b = 2,20 \\ \text{Index de précision} & \lambda = 0,48 \end{array}$$

Une seconde expérience n'a pas donné de meilleurs résultats.

TABLEAU XIII

Activité de l'hormone parathyroïdienne Lilly, lot n°9 J 73
sur la calcémie des rats (SD) 6 heures
après thyroparathyroïdectomie par excision

Calcémie mg p.100 après PTH Unités USP par rat				
0	2,5	5	10	20
7,0 $\pm$ 0,14 (8)	8,2 $\pm$ 0,31 (8)	8,8 $\pm$ 0,41 (8)	9,3 $\pm$ 0,33 (8)	10,6 $\pm$ 0,52 (8)

() Nombre d'animaux

II- RATS WISTAR

La comparaison entre les trois techniques opératoires a été faite en injectant aussitôt après l'opération, soit du sérum physiologique pour le groupe témoin, soit 2,5, 5, 10 et 20 USP par rat, pour les autres groupes. Le calcium sérique est dosé 6 heures après. Les résultats sont les suivants :

1) Parathyroïdectomie par cautérisation

Cette technique est pratiquée sur 31 rats (Tableau XIV). La courbe d'activité a les caractéristiques suivantes :

$$\begin{array}{ll} \text{Pente} & b = 3,15 \\ \text{Index de précision} & \lambda = 0,34 \end{array}$$

Nous constatons que la pente est plus faible que celle obtenue avec les rats (SD) dont la sensibilité est moins importante: avec 10 USP nous obtenons une augmentation de 2,9mg de calcium pour 100ml de sérum. L'écart-type est de même ordre pour les deux souches de rats pour cette technique opératoire.

TABLEAU XIV

Activité de l'hormone parathyroïdienne Lilly, lot IVX 63 A
sur la calcémie des rats Wistar 6 heures
après parathyroïdectomie par cautérisation

Calcémie mg p.100 après PTH Unités USP par rat				
0	2,5	5	10	20
6,9 $\pm$ 0,27 (7)	7,7 $\pm$ 0,13 (6)	9,2 $\pm$ 0,46 (6)	9,8 $\pm$ 0,29 (6)	10,7 $\pm$ 0,69 (6)

() Nombre d'animaux

Nous arrivons à ramener la calcémie de rats parathyroïdectomisés au taux des rats non opérés avec 20 USP (la calcémie des rats intacts est de 10,5mg p.cent).

2) Thyroparathyroïdectomie par cautérisation

Cette expérience est pratiquée sur un lot de 30 rats (Tableau XV).

La courbe d'activité a les caractéristiques suivantes :

Pente $b = 3,68$

Index de précision $\lambda = 0,28$

TABLEAU XV

Activité de l'hormone parathyroïdienne Lilly, lot n° IVX 63 A
sur la calcémie des rats Wistar 6 heures
après thyroparathyroïdectomie par cautérisation

Calcémie mg p.100 après PTH Unités USP par rat				
0	2,5	5	10	20
7,1 $\pm$ 0,25 (6)	8,4 $\pm$ 0,26 (6)	8,5 $\pm$ 0,36 (6)	10,3 $\pm$ 0,45 (6)	11,4 $\pm$ 0,59 (6)

() Nombre d'animaux

Ces résultats sont plus satisfaisants que les précédents. La pente est plus importante et la variation individuelle est plus

faible qu'avec la parathyroïdectomie par cautérisation. Cette technique pratiquée sur les rats Wistar donne de meilleurs résultats qu'avec la souche SD : 10 USP par rat augmentent la calcémie de 3,2mg pour 100ml de sérum.

3) Thyroparathyroïdectomie par excision

Nous avons fait d'abord un sondage sur un groupe de 16 rats dont la moitié reçoit du sérum physiologique et sert de témoin, l'autre moitié reçoit 20 unités USP par rat. L'augmentation moyenne de calcium sérique a été de 4mg pour 100ml.

Cette technique a été pratiquée sur 2 lots de rats recevant des doses croissantes de PTH comme dans les expériences précédentes (Tableau XVI).

La courbe d'activité a les caractéristiques suivantes :

	<u>Pente (b)</u>	<u>Index de précision (λ)</u>
Série 1	5,93	0,29
Série 2	3,97	0,24

TABLEAU XVI

Activité de deux lots d'hormone parathyroïdienne Lilly
sur la calcémie des rats Wistar 6 heures
après thyroparathyroïdectomie par excision

Calcémie mg p.100 après PTH Unités USP par rat				
0	2,5	5	10	20
(*) 6,2 ± 0,21 (6)	7,8 ± 0,38 (6)	8,7 ± 0,35 (6)	9,8 ± 0,39 (6)	11,5 ± 0,43 (6)
(**) 6,7 ± 0,14 (8)	8,5 ± 0,37 (8)	10,1 ± 0,27 (8)	10,6 ± 0,68 (8)	13,5 ± 0,55 (8)

(*) Lot 12234 B
(**) Lot IVX 63 A

() Nombre d'animaux

Cette dernière technique opératoire donne les résultats les plus satisfaisants avec cette souche de rats Wistar : la pente est plus forte et l'index de précision suffisant.

En résumé, les expériences faites comparativement sur deux souches de rats Sprague-Dawley et Wistar (Tableau XVII) indiquent une certaine différence de sensibilité ; la parathyroïdectomie par cautérisation est préférable pour les rats Sprague Dawley tandis que la thyroparathyroïdectomie par excision donne de meilleurs résultats pour les rats Wistar.

TABLEAU XVII

Comparaison de la pente (b) et de l'index de précision (λ) des courbes d'activité de PTH sur des rats Sprague Dawley (SD) ou Wistar (W) après parathyroïdectomie (PxC) par cautérisation, thyro-parathyroïdectomie par cautérisation (ThpxC) ou par excision (ThpxE)

Rats	PxC		ThpxC		ThpxE	
	b	λ	b	λ	b	λ
SD	<u>5,33</u>	<u>0,248</u>	2,83	0,591	3,62	0,48
W	3,15	0,342	3,68	0,285	<u>3,97</u>	<u>0,24</u>

DISCUSSION

Les rats Sprague-Dawley présentent 6 heures après parathyroïdectomie par cautérisation une calcémie très nettement inférieure à celle observée sur des rats Wistar dans les mêmes conditions. Celle-ci est plus élevée pour les rats SD privés de l'ensemble thyroïde-parathyroïdes, soit par excision, soit par cautérisation. Dans ce dernier cas, la libération de calcitonine n'est pas exclue mais son activité n'est plus mesurable en 6 heures, la TCT ayant un temps d'action voisin de 1 heure même chez l'animal thyroparathyroïdectomisé.

Par contre, nous n'avons pas observé de différence significative de la calcémie de base en fonction des trois techniques opératoires sur les rats de souche Wistar.

La sensibilité à la parathormone exogène est maximale en 6 heures après parathyroïdectomie par cautérisation chez les rats SD. La courbe d'activité log-dose a une pente supérieure à celle obtenue avec les autres techniques opératoires sur les rats SD ou Wistar. La thyroparathyroïdectomie par excision donne les résultats les plus reproductibles quant à l'activité de la parathormone chez les rats Wistar.

Il faut également souligner qu'un délai de 3 jours après parathyroïdectomie par cautérisation rend les rats moins sensibles à l'action de la parathormone comme une prolongation de la carence en calcium alimentaire.

En conclusion, l'importance relative de la parathormone et de la calcitonine mise en évidence par les différentes techniques opératoires cautérisation des parathyroïdes, de la thyroïde et des parathyroïdes ou excision de l'ensemble, varie d'une souche de rats à une autre, cela nous conduira à recommander le rat Wistar au sevrage thyroparathyroïdectomisé par excision pour un test d'activité de l'hormone parathyroïdienne. Cet animal est très sensible (2,5 à 20 USP) à l'action hypercalcémiante de PTH dans les 6 heures qui suivent la thyroparathyroïdectomie.

C H A P I T R E I V

DOSAGES BIOLOGIQUES DE LA PARATHORMONE

RAT

Différentes méthodes de dosage de la parathormone ont été proposées faisant appel à des propriétés physiologiques diverses. Les revues de GREEP et KENNY (1955) et THORP (1962) résument les principales. L'activité étalon encore actuellement inscrite à diverses Pharmacopées est mesurée sur le chien suivant des procédés dérivés de celui décrit par COLLIP et coll. (1925). La purification de la parathormone a, en fait, été suivie par des méthodes biologiques utilisant le rat. Nos résultats soulignent l'importance du régime (Ca et vitamine D), l'âge du rat, la souche, la technique opératoire : thyroparathyroïdectomie totale ou parathyroïdectomie nous ont incité à codifier une méthode simple et reproductible de dosage de l'activité parathyroïdienne hypercalcémiante sur le rat.

Après avoir titré notre échantillon de référence suivant le procédé du Codex français VIIIème édition 1965, sur le chien, nous avons comparé trois techniques couramment utilisées sur le rat. DAVIES, GORDON et MUSSETT (1954), RASMUSSEN et WESTALL (1957) et MUNSON (1961) à une technique personnelle utilisant le rat Wistar au sevrage.

EXPERIMENTATION

I- TITRAGE DE L'ECHANTILLON DE PTH DE REFERENCE

La solution d'hormone parathyroïdienne employée est la préparation Lilly titrée suivant l'USP et dont l'activité a été vérifiée d'après le procédé décrit au Codex, VIIIème édition, 1965.

10 chiens mâles adultes, en bonne santé, habitués à la ponction veineuse, pesant de 9 à 15kg, reçoivent le régime U.A.R. (aliments pour chiens) depuis quelques jours. Les chiens sont soumis à la diète hydrique 24h avant l'essai, le sang est prélevé sans anticoagulant à la veine saphène.

Dans l'essai préliminaire recommandé, nous avons déterminé sur 3 chiens la dose d'extrait parathyroïdien pouvant provoquer une variation maximale de l'ordre de 1 à 5mg pour 100ml et le délai nécessaire pour obtenir cette hypercalcémie. Le volume injecté fut de 2,5ml par chien. La parathormone Lilly (lot n° 842 947) est administrée à 23h30 à 10 chiens par voie sous-cutanée. Nous avons fait des ponctions veineuses toutes les deux heures entre 8 et 18 heures après l'injection et nous avons ainsi déterminé l'augmentation maximale du taux de calcium sérique pour chaque chien (Tableau XVIII).

Il faut souligner immédiatement la variation du délai de réponse maximale (Figure 3) s'étageant entre 8 et 18 heures confirmant la nécessité des prélèvements en série sur tous les animaux. L'évolution de la calcémie est très variable d'un chien à l'autre : pour certains la calcémie augmente de façon continue, pour d'autres le maximum est suivi d'un plateau ou au contraire d'une chute rapide. De plus, pour 3 chiens, la valeur la plus élevée a été observée en 18 heures, sans que l'on puisse assurer qu'elle représente bien le maximum pour ces animaux.

Au point de vue quantitatif, la dose injectée correspondait à 405 USP (2,5ml x 162 USP) par chien, soit une variation théorique de la calcémie de 4,05mg pour 100ml de sérum. La moyenne

TABLEAU XVIII

Variation du délai et de l'intensité de la réponse maximale (chiffres soulignés)
à l'injection de 405 USP de PTH chez 10 chiens normaux

Chiens	Calcémie initiale mg %	Calcémie mg p.100 à des temps variables après injection de PTH					
		8h	10h	12h	14h	16h	18h
1	10,4	13,7	14,7	<u>15,6</u>	15,0	15,5	15
2	9,6	11,5	12,2	12,8	12,6	12,9	<u>13,2</u>
3	9,6	12,6	12,5	<u>16,0</u>	14,9	15,4	12,8
4	9,7	11,8	13,0	14,8	<u>17,0</u>	16,4	15,8
5	9,6	11,2	11,5	12,3	<u>13,4</u>	12,3	12,3
6	8,8	9,7	10,1	10,3	10,8	<u>13,8</u>	10,6
7	9,6	13,0	13,3	13,4	13,8	14,0	<u>14,3</u>
8	10,0	<u>12,9</u>	11,5	11,5	11,5	11,7	12,0
9	10,1	11,9	12,4	12,4	12,5	12,5	<u>14,0</u>
10	10,2	12,3	12,9	13,5	13,6	<u>14,6</u>	14,1

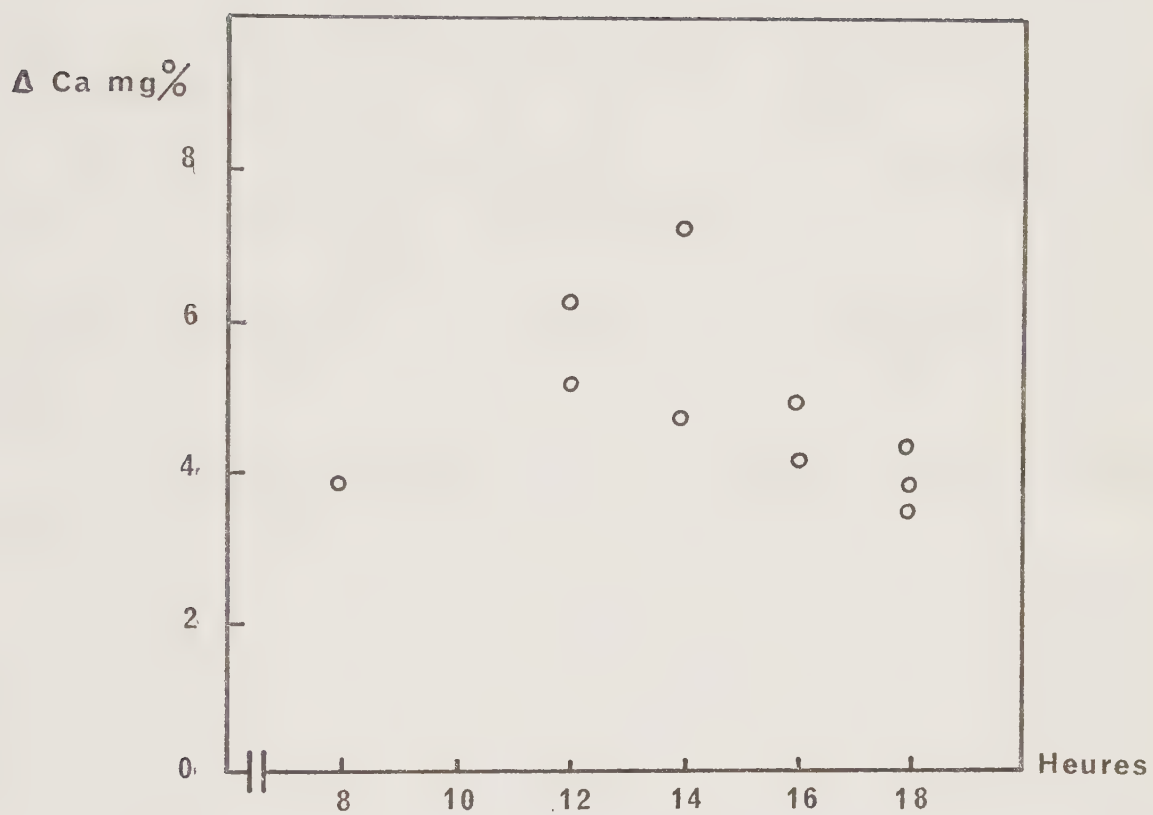


Figure 3 - Variation maximale de la calcémie mg p.cent après injection de 405 unités USP de PTH par chien, en fonction du temps.

obtenue sur nos animaux est de $4,73 \pm 0,42/100\text{ml}$. Nous pouvons d'après le Codex conclure que notre extrait de référence est conforme au type standard.

II- TEST DE DAVIES, GORDON et MUSSETT (1954) MODIFIÉ

Ces auteurs pratiquent un essai biologique croisé en trois points . 24 rats pie (Norvégiens) pesant entre 200 à 250g sont parathyroïdectomisés par cautérisation et environ 10 jours après divisés en 6 groupes de 4 rats. Chaque rat reçoit le premier jour de l'expérience, soit la PTH standard, soit la préparation inconnue X et inversement 2 à 4 jours plus tard.

Chaque animal étant son propre témoin, la prise de sang par ponction cardiaque se fait avant et 21h après l'injection du produit.

La variation de calcium sérique obtenue dans ces conditions est de 1,8mg p.cent pour 60 USP de parathormone.

Les modifications que nous avons apportées sont les suivantes: rats de souche Sprague Dawley plus jeunes (150g) et utilisation de chaque animal une seule fois 3-4 jours seulement après l'opération. Les doses sont calculées pour 100g de poids corporel. Nous avons utilisé un lot de 24 rats parathyroïdectomisés par cautérisation maintenus au régime standard 3 à 4 jours avant et pendant l'expérience. Ce lot est divisé en 3 groupes recevant respectivement 5, 10 et 20 USP pour 100 grammes d'animal. La calcémie est déterminée sur chaque rat. Le produit est injecté en deux fois 18 et 14h avant le second prélèvement de sang. La différence du taux de calcium sérique entre les deux prélèvements correspond à l'activité de l'hormone parathyroïdienne (Tableau XIX).

Pente	$b = 5,09$
Index de précision	$\lambda = 0,16$

TABLEAU XIX

Comparaison des résultats obtenus avec trois types d'essai d'activité biologique de la parathormone, lot n° 9 GZ 15 BA

Types d'essai d'activité biologique	Hypercalcémie après PTH Unités USP/100g rat			b	λ
	5	10	20		
Test de DAVIES et coll (1954) modifié	- 0,1 $\pm$ 0,2 (8)	+ 1,2 $\pm$ 0,3 (8)	+ 2,9 $\pm$ 0,2 (7)	5,09	0,16
	+ 1,5 $\pm$ 0,4 (8)	+ 2,1 $\pm$ 0,2 (8)	+ 2,1 $\pm$ 0,4 (8)	0,89	0,64
	+ 1,9 $\pm$ 0,7 (6)	+ 3,8 $\pm$ 0,5 (6)	+ 5,0 $\pm$ 0,4 (6)	5,24	0,25
Test de RASMUSSEN et WESTALL (1957)					
Test de MUNSON (1961)					

() Nombre d'animaux

Cette méthode est très sensible entre 10 et 20 USP/100g de rat. Il n'y a pas d'activité avec la dose 5 USP/100g de rat. La variation de calcémie est de 2,9mg p.cent avec 20 USP donc beaucoup plus forte que celle indiquée par les auteurs.

III- TEST DE RASMUSSEN ET WESTALL (1957)

Ces auteurs avaient constaté que certaines fractions purifiées d'extraits parathyroïdiens sont peu actives sur le rat 2lh après l'injection, par contre ces mêmes fractions provoquent une élévation maximale de calcium sérique entre 5 et 7h après l'injection. Le temps choisi pour la mesure de l'activité est donc ramené à 6 heures après l'injection. Nous avons fait l'expérience dans ces conditions.

Nous prenons un lot de 24 rats parathyroïdectomisés et maintenus au régime standard 3 à 4 jours. Ces rats sont soumis à la diète hydrique la veille et pendant l'expérience. Ce lot est divisé en 3 groupes de 8 rats qui reçoivent des doses fractionnées d'hormone parathyroïdienne 5, 10, 20 USP pour 100g de poids. La calcémie de chaque rat est déterminée avant et 6 heures après l'injection. La différence entre les deux taux de calcium sérique représente l'activité de PTH. Les résultats sont exposés dans le tableau XIX .

$$\begin{array}{ll} \text{pente} & b = 0,89 \\ \text{index de précision} & \lambda = 0,64 \end{array}$$

Le maximum de sensibilité est obtenu avec 10 USP/100g de rat.

IV- TEST DE MUNSON (1961)

Les rats reçoivent un régime sans calcium 4 jours avant l'opération (KENNY et MUNSON, 1959). Nous avons pris un lot de 24 rats divisés en 4 groupes et recevant aussitôt après la para-

thyroïdectomie par cautérisation respectivement :

- du sérum physiologique
- 5 USP
- 10 USP
- 20 USP de parathormone Lilly pour 100g de rat.

Six heures après l'injection, on prélève environ 1,5ml de sang par ponction cardiaque et on détermine le taux de calcium sérique pour chaque rat (Tableau XIX) :

Pente	$b = 5,24$
Index de précision	$\lambda = 0,25$

Nos résultats concordent avec ceux de MUNSON qui trouvent un index de précision $\lambda = 0,27$.

Ce procédé est donc reproductible et a l'avantage de n'exiger qu'un seul prélèvement et par conséquent un seul dosage de calcium sérique par rat, il peut être exécuté en une journée.

Les trois essais étudiés ci-dessus, qui sont les plus utilisés donnent dans nos conditions de laboratoire des résultats satisfaisants bien que la sensibilité des animaux soit souvent différente de celle observée par les auteurs de ces méthodes. Il peut y avoir plusieurs causes à cela : la souche de rat, la nature et l'activité de la préparation étalon de parathormone, la composition du régime et la technique de parathyroïdectomie par cautérisation qui risque d'entraîner la libération de quantités variables de thyrocalcitonine susceptible d'atténuer irrégulièrement la réponse de PTH.

V- METHODE PERSONNELLE^{*}

Nous nous proposons d'utiliser le rat mâle Wistar au sevrage thyroparathyroïdectomisé par excision, injection immédiate, activité en 6 heures.

* Description détaillée en Annexe

Les divers arguments qui nous ont conduit à recommander le test ci-dessus sont de plusieurs ordres :

Rats au sevrage : cela évite l'utilisation de régimes hypocalciques plus ou moins complexes et d'ailleurs certains auteurs et nous-même avons signalé qu'après un temps assez long de carence en calcium le rat devenait insensible à la parathormone.

Il suffit de mettre les animaux à jeun la veille de l'essai. La quantité de PTH à utiliser est plus faible qu'avec des rats plus gros.

Thyroparathyroïdectomie par excision : ce procédé permet de supprimer à la fois la source d'hormone hypercalcémiante et hypocalcémiante, conduisant à une plus grande régularité de la calcémie de base. D'autre part, chez le rat jeune la ligature des artères thyroïdiennes n'est pas indispensable, l'animal saigne peu ce qui raccourcit le temps opératoire.

La reproductibilité de la méthode est indiquée par le tableau XX. L'index de précision est très voisin de celui obtenu par MUNSON (1955) ou par CAUSTON, CHORLTON et ROSE (1965) qui utilisent la même méthode opératoire sur des rats soumis à un régime pauvre en calcium pendant 7 jours.

TABLEAU XX

Reproductibilité des essais répétés sur divers étalons de PTH

Nombre de rats	32	32	28	24	Moyennes
Calcémie des témoins (mg p.100)	6,7	6,3	7,4	6,3	6,6
Hypercalcémie pour 10 USP (mg p.100)	3,9	3,4	3,6	2,6	3,3
Pente (b)	5,49	3,97	5,76	3,90	4,78
Index de précision (λ)	0,21	0,24	0,18	0,31	0,23

La thyroparathyroïdectomie par excision qui nous a donné les meilleurs résultats avec les rats Wistar au sevrage est également la technique recommandée par SAMIR AMER en 1968. Sur des rats Holtzman mâles et femelles de 4 à 6 semaines pesant environ 100/130g, cet auteur obtient quelques jours après thyroparathyroïdectomie chirurgicale des réponses environ moitié de celles que nous obtenons avec nos animaux.

POULET

Nous avons étudié la possibilité d'utiliser comme test d'activité biologique de PTH, le poulet et le poussin qui ont l'avantage de répondre sans parathyroïdectomie à l'injection de parathormone. POLIN et coll. (1957) sur des poulets de 5 à 7 semaines obtiennent une réponse linéaire à la suite d'injections de doses croissantes de PTH de 50 à 200 unités USP (réponse 2,1mg/100ml pour 100 USP) chez les coqs de 5 à 7 semaines.

Nous avons utilisé des animaux plus jeunes. Nous avons pris des poussins mâles (Hybride Hubbard). Ils reçoivent dès l'éclosion, le régime normal commercial FRAB* supplémenté avec 0,5µg de vitamine D₃ par jour ; 3 semaines après, ce lot de 32 poulets est divisé en 4 groupes : le premier groupe reçoit du sérum physiologique et nous sert de témoin, les trois autres groupes reçoivent respectivement 10, 20 et 40 unités USP de parathormone (Lilly, lot n° 842 947) pour 100g de poulet. Nous dosons le calcium sérique 3 heures après l'injection sous-cutanée du produit. Nous obtenons une courbe linéaire avec une pente $b = 2,93$ et $\lambda = 0,20$ (Tableau XXI) (Figure 4).

Une autre expérience nous a montré que le supplément de vitamine D₃ au régime normal déjà vitaminé, n'a pas d'effet sur l'activité de l'hormone parathyroïdienne. Il suffit donc d'élever les poussins avec un régime complet pour les utiliser comme test de l'activité parathyroïdienne.

* Voir Techniques et Matériel

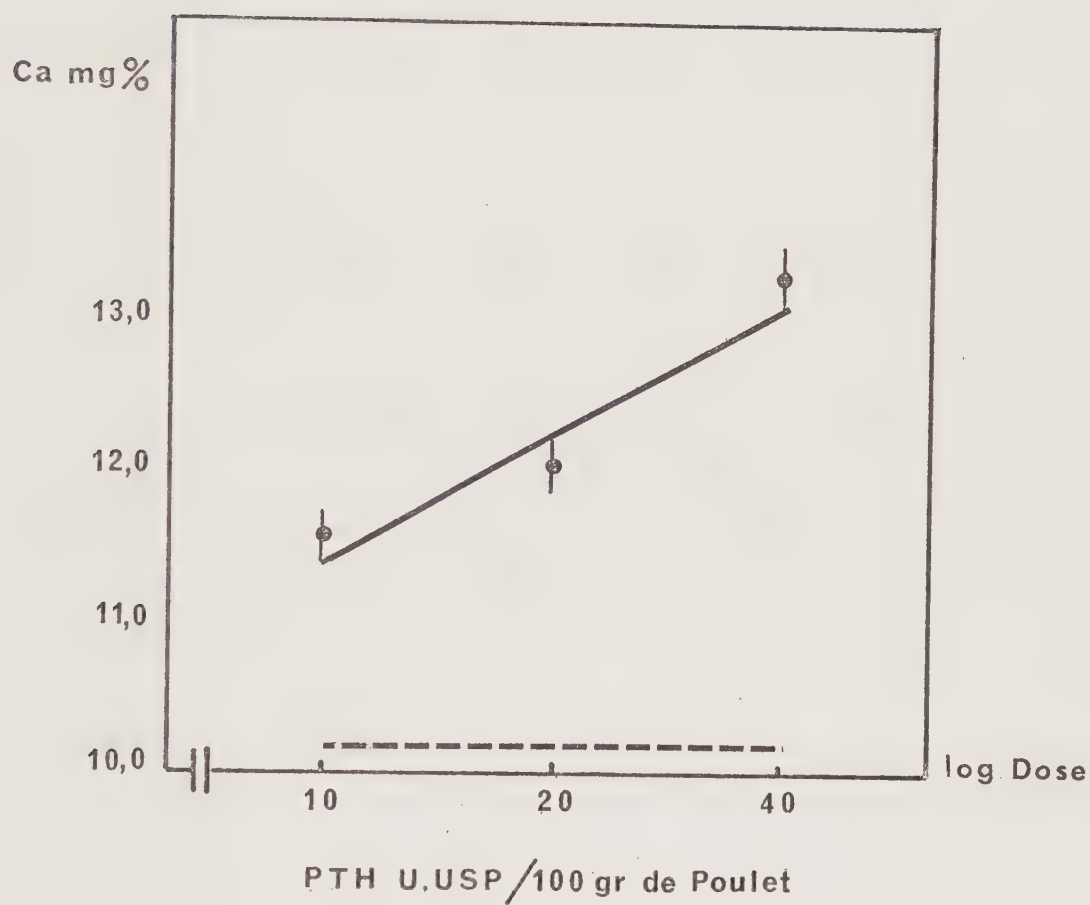


Figure 4 - Variation (log-dose) de la calcémie du poulet de 3 semaines
3h après injection de PTH
(ϕ erreur-type à la moyenne sur 8 animaux)

TABLEAU XXI

Activité en 3h de PTH sur la calcémie
des poulets de 3 semaines (moyenne sur 8 animaux par groupe)

PTH en USP 100g de poulet	0	10	20	40
Ca mg p.100	$10,2 \pm 0,1$	$11,6 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,3$	$13,3 \pm 0,2$
Variations		+ 1,4	+ 1,8	+ 2,1

La difficulté de s'approvisionner en poulets de 3 semaines et l'obligation de les élever au laboratoire nous ont incité à étudier les réponses des animaux à l'éclosion. Les poussins d'un jour s'obtiennent facilement et ne nécessitent aucun soin avant l'expérience.

Poussins de 1 jour

Les poussins sont divisés en 5 groupes de 9 animaux dont l'un reçoit du sérum physiologique par voie sous-cutanée et les autres 2,5 , 5, 10 et 20 unités USP par poussin. Nous dosons le calcium sérique 3 heures après l'injection du produit.

La prise de sang s'effectue par ponction cardiaque et le dosage de calcium se fait selon la méthode précédemment décrite (Perkin Elmer 303).

Nous avons obtenu une courbe linéaire avec une réponse maximale 2,5mg pour 100ml. La pente de cette courbe est $b = 2,78$ et $\lambda = 0,20$ (Tableau XXII, série 1) (Figure 5).

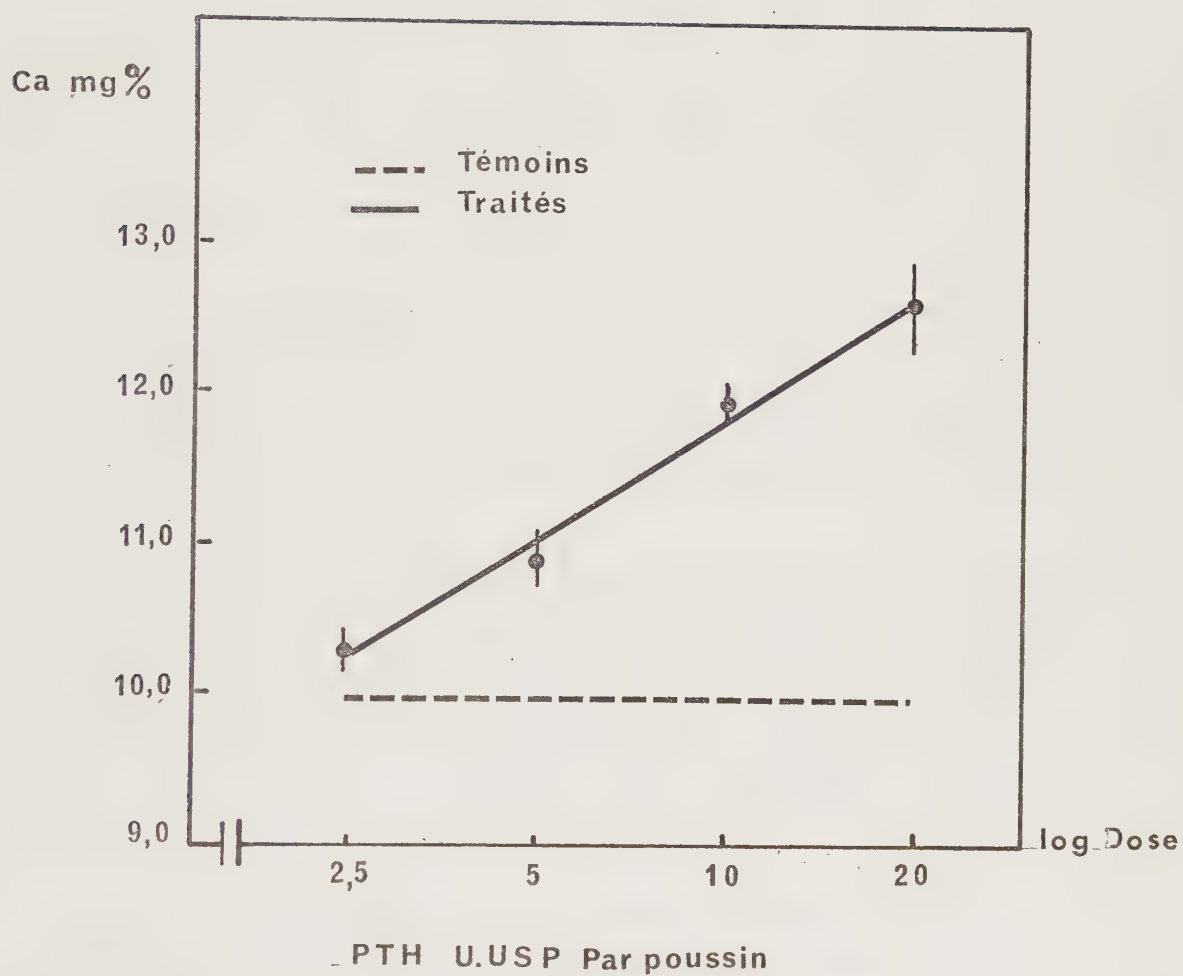


Figure 5 - Variation (log-dose) de la calcémie du poussin de 1 jour 3h après injection de PTH.

(ϕ erreur-type à la moyenne sur 8 animaux)

TABLEAU XXII

Action en 3 heures de doses croissantes de parathormone
sur la calcémie du poussin de 1 jour

Calcémie mg p.100 après PTH Unités USP par poussin					
	0	2,5	5	10	20
Série I	10,0 $\pm$ 0,2 (9)	10,3 $\pm$ 0,1 (8)	10,9 $\pm$ 0,2 (8)	11,9 $\pm$ 0,1 (8)	12,6 $\pm$ 0,3 (8)
Série II	9,4 $\pm$ 0,2 (9)	9,9 $\pm$ 0,1 (9)	10,2 $\pm$ 0,2 (9)	11,5 $\pm$ 0,2 (9)	12,4 $\pm$ 0,4 (9)

() Nombre de poussins par groupe

Nous avons recommencé l'expérience sur un autre lot de 45 poussins et nous avons obtenu une pente $b = 2,93$ et $\lambda = 0,27$ (Tableau XXII, série 2).

Ces courbes d'activité ont des indices de précision voisins de ceux obtenus sur le rat parathyroïdectomisé ou thyroparathyroïdectomisé. Ce procédé a l'avantage d'être plus rapide puisqu'il n'y a pas d'opération à effectuer sur les animaux. Le prix de revient du poussin est moins élevé, cependant la sensibilité est moindre que celle du rat.

La recommandation de ce procédé nécessite auparavant une étude plus détaillée, particulièrement en ce qui concerne l'activité de préparations parathyroïdiennes à différents degrés de purification.

DISCUSSION

La comparaison de quatre procédés différents de dosage de l'activité hypercalcémiant de la parathormone, nous a permis de constater une concordance satisfaisante entre nos résultats et ceux publiés par les auteurs eux-mêmes. Cependant, la sensibilité des rats d'âge différent, de souche différente, opérés par cautérisation ou par excision, est variable selon chaque procédé utilisé (Tableau XXIII).

TABEAU XXIII

Comparaison de l'hypercalcémie obtenue
selon différents types d'essai d'activité biologique
de la parathormone (PTH)

Type d'essai d'activité biologique	Poids du rat g	PTH Unités USP/rat	Variation calcémie mg p.100
Test de DAVIES et coll. (1954)	200/250	60	+ 1,8
d ^e modifié	150	20	+ 2,9
Test de RASMUSSEN et WESTALL (1957)	120	50	+ 2,2
Test de MUNSON (1961)	150	15	+ 2,0
Méthode personnelle	50	10	+ 3,3

Ces chiffres soulignent la nécessité de disposer d'une préparation de référence pour étalonner le titrage sur le rat ou de préciser l'origine, le poids, la souche, la technique opératoire pour fixer des conditions de standardisation chez cet animal.

Nous avons vu que le titrage sur le chien normal présente lui-même des difficultés dues au nombre d'animaux et à la variabilité de l'horaire de la réponse maximale d'un chien à l'autre. L'emploi du chien thyroparathyroïdectomisé théoriquement plus satisfaisant, se heurte en fait, à l'apparition rapide d'une hypocalcémie mortelle.

La réponse du poussin à l'injection de parathormone est très nette et pourrait peut-être conduire à une standardisation plus rapide des conditions d'expérience. En effet, cet animal est utilisable dès l'éclosion, donc sans consommation de régime alimentaire et sans opération préalable.

En conclusion, les méthodes de dosage de la parathormone sur le rat conduisent à des résultats satisfaisants et reproductibles si tous les éléments sont bien standardisés : rats au sevrage, thyroparathyroïdectomisés par excision, test en 6 heures.

DEUXIEME PARTIE

THYROCALCITONINE
=====

C H A P I T R E I

ACTION DE LA THYROCALCITONINE SUR LE RAT NORMAL

L'activité biologique de la thyrocalcitonine se manifeste par une baisse de la calcémie et de la phosphatémie dont le mécanisme initial est attribué à l'inhibition du catabolisme osseux (MILHAUD, PERAULT, MOUKHTAR, 1965).

Nous allons étudier chez le rat au sevrage ou âgé de 5 à 6 semaines, de souche Wistar ou Sprague Dawley, l'activité de différents échantillons de calcitonine de porc sur le calcium et parallèlement sur le phosphate sériques.

L'unité d'activité de la thyrocalcitonine est généralement exprimée en unités MRC (Medical Research Council) : quatre ampoules d'une préparation standard A ont par définition une activité biologique de 1 unité MRC soit 0,25 U MRC pour 10mg d'un produit préparé selon BAGHDIA NTZ et coll. (1964). Cependant, dès 1964 HIRSCH et coll. avaient proposé de prendre pour unité d'activité de la thyrocalcitonine la quantité d'extrait thyroïdien qui abaisse d'un milligramme p.cent, la calcémie du rat de 150 à 180g, une heure après l'injection sous-cutanée. BAGHDIA NTZ en 1964 avait

proposé une unité 10 fois plus faible que celle de HIRSCH, puisque c'était la quantité de thyrocalcitonine nécessaire pour abaisser de 0,1mg p.cent la calcémie du rat de 150g. MILHAUD en 1965 a choisi une unité correspondant à celle de BAGHDIAANTZ. Le facteur empirique serait d'après HIRSCH et MUNSON (1969) de 1000 unités BAGHDIAANTZ ou MILHAUD pour 1 MRC, ce qui signifierait que 10 milli-unités MRC donnent une hypocalcémie de 1mg p.100ml de sérum.

Nous allons exposer quelques aspects de l'activité de la calcitonine sur le rat normal : rôle d'une protéine d'accompagnement, de l'origine et de l'âge du rat. Puis nous étudierons les réactions du rat thyroparathyroïdectomisé traité ou non par la thyroxine ou la vitamine D.

D'autre part, nous étudierons l'action de la calcitonine sur la calcémie du poussin et de la poule pondeuse.

I- ACTION DE T.C.T. SUR LE RAT NORMAL

Matériel et techniques utilisés

. Animaux

a) au sevrage : 40-50g

Nous utilisons les rats mâles provenant de deux élevages différents ^(*)_(**). Ces animaux ne restent pas plus de trois jours au laboratoire et sont nourris avec un régime standard (Ratigène)^{††}

b) animaux jeunes en pleine croissance : 110-120g Sprague Dawley^{*}

Tous ces animaux sont mis à la diète hydrique 18 à 20h avant l'expérience.

(*) Sprague Dawley (SD) et Wistar (W) : EVIC CEBA (Masson)

(**) " (SD) : Centre de Recherche et d'Elevage des
Oncins (IFFA)

†† A.E.C. Commentry (03)

• Echantillons de T.C.T. de référence

Nous avons utilisé les échantillons suivants :

K 489 017 B	TCT hautement purifiée	68 MRC/mg
K 423 115	TCT lyophilisée	200 MRC/flacon
RA 1501	TCT "	25 MRC/flacon
Ky 12001, lot 489, TCT		9 MRC/mg

Ces produits ont été titrés par ARMOUR et conservés à -20°.

• Préparation de la T.C.T. et volume injecté

Les différentes préparations de calcitonine sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique 0,001 N. La solution obtenue est diluée avec une solution de gélatine (à 1p.100 dans le soluté isotonique à 0,9g ClNa p.100, pH 3,2).

Cette préparation est administrée par voie sous-cutanée. Lorsque nous injectons le produit par voie intraveineuse, nous diluons le soluté chlorhydrique de thyrocalcitonine avec un tampon d'acétate de Na à pH 4,6 dont la composition est la suivante :

A/	acide acétique 0,2 M (12g p.1000)	20ml
B/	acétate de Na soit anhydre :16,4g p.1000	30ml
	soit 3 H ₂ O :27,2g p.1000	
C/	H ₂ O distillée q.s.p.	100ml

Le volume injecté est de 0,25ml de soluté de thyrocalcitonine diluée par animal.

• Voie d'administration

Voie sous-cutanée : région dorsale de l'animal

Voie intraveineuse : veine latérale de la queue

• Importance de la nature du solvant

PARSONS (1968) et PARSONS et WOODWARD (1968) ont attiré l'attention sur le renforcement de l'activité de la calcitonine par une addition de protéine.

Nous avons comparé l'activité d'une même calcitonine de porc hautement purifiée 68 MRC/mg, injectée par voie sous-cutanée, soit dans une solution de gélatine à pH 3,2, soit dans une solution tampon acétate de Na. Cette comparaison a été faite sur un lot de rats Wistar au sevrage à jeun pendant 18 à 20h. Les résultats sont exposés dans le tableau XXIV et la figure 6.

TABLEAU XXIV

Comparaison de l'activité de la thyrocalcitonine (TCT)
sur le Ca et le P sériques en fonction du solvant:
gélatine et acétate de Na (Injection sous-cutanée)

Solvant	Sérum mg %	TCT mU MRC/rat			
		0	5	15	45
Gélatine	Ca	10,13 [*] ± 0,46	9,85 ± 0,11	8,59 ± 0,17	7,84 ± 0,11
	P	8,71 ± 0,40	8,00 ± 0,33	6,65 ± 0,31	6,31 ± 0,18
Acétate de Na	Ca	10,83 ± 0,10	10,52 ± 0,36	10,40 ± 0,33	10,12 ± 0,52
	P	8,96 ± 0,41	9,50 ± 0,31	9,12 ± 0,57	8,56 ± 0,24

* Chaque chiffre représente la moyenne de 5 rats

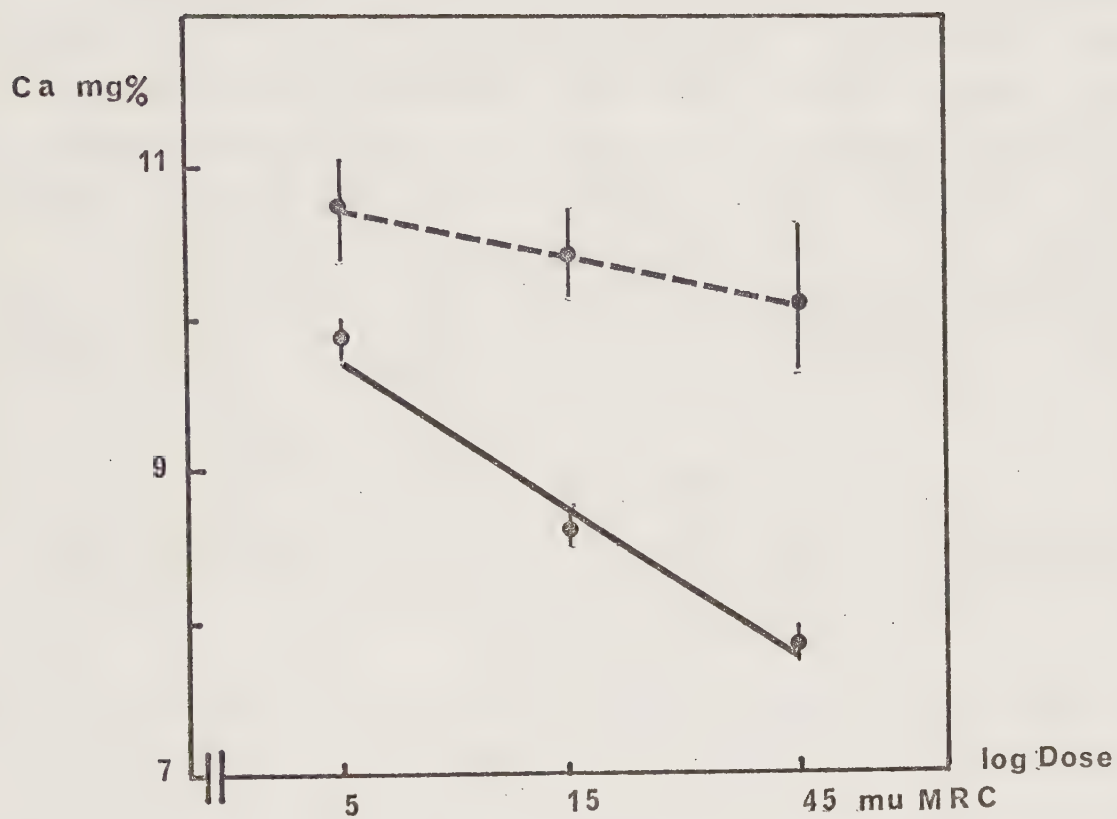


Figure 6 - Comparaison de l'activité de la T.C.T. injectée dans une solution de gélatine ———
 " d'acétate de Na -----
 (• erreur-type à la moyenne sur 5 animaux)

La calcitonine diluée dans l'acétate de Na ne provoque pas, en 60 minutes, d'hypocalcémie, ni d'hypophosphatémie significatives. En revanche, la même quantité d'hormone diluée dans la gélatine abaisse le calcium et le phosphore sériques de ces rats.

Nous confirmons dans ces essais l'importance de la présence d'une protéine (la gélatine) pour observer l'activité physiologique de la thyrocalcitonine hautement purifiée par voie sous-cutanée.

Nous avons également observé que la solution de gélatine doit avoir été récemment préparée. En effet, l'utilisation comparative d'une solution de gélatine conservée 2 semaines à +4° ou préparée extemporanément montre que l'activité biologique de la calcitonine est supérieure dans ce dernier cas (Tableau XXV).

Il est donc clair que nous n'utiliserons plus dans la suite du travail que des solutions de gélatine préparées au moment de l'emploi pour l'injection, par voie sous-cutanée.

TABEAU XXV

Comparaison de l'activité de la thyrocalcitonine injectée dans la gélatine préparée soit extemporanément, soit 15 jours avant sur le Ca et le P sériques (mg p.100)

TCT mU MRC/rat	Ca		P	
	0	15	0	15
Gélatine extemporanément	$10,52 \pm 0,08^*$	$7,42 \pm 0,16$	$8,94 \pm 0,14$	$6,94 \pm 0,22$
Gélatine 15j.avant	$10,52 \pm 0,08$	$8,92 \pm 0,27$	$8,94 \pm 0,14$	$7,96 \pm 0,11$

* Chaque chiffre représente la moyenne de 5 rats

• Voie d'introduction de la thyrocalcitonine

MILHAUD (1969) a observé que l'hypocalcémie et l'hypophosphatémie produites par la thyrocalcitonine nécessitent quatre fois moins d'hormone si l'on utilise la voie intraveineuse, plutôt que la voie sous-cutanée. STURTRIDGE et KUMAR (1968) prélèvent le sang 30 minutes après l'injection intraveineuse de la calcitonine.

Nous avons voulu comparer l'importance de l'activité physiologique de l'hormone selon la voie d'administration. L'expérience a été faite sur des rats Sprague Dawley au sevrage avec la même préparation de thyrocalcitonine. Les doses injectées sont de 5 et 15 mU MRC/rat par voie sous-cutanée (solvant gélatine) (durée 1h) et 1 et 3 mU MRC/rat par voie intraveineuse (durée 30 minutes) (solvant acétate).

Les résultats sont présentés dans le tableau XXVI et la figure 7. La pente des droites pour les variations de calcémie sont identiques pour les deux voies d'injection mais il faut 5 fois plus de TCT par voie sous-cutanée pour avoir la même réponse que par la voie veineuse. La baisse du phosphate sérique est significative dans les deux cas.

TABLEAU XXVI

Comparaison de l'effet hypocalcémiant de la thyrocalcitonine injectée par voie sous-cutanée (durée 1h) ou intraveineuse (durée 30 minutes) sur les rats Sprague Dawley au sevrage

Exp. N°	Voies d'administration	TCT mU MRC/rat	Calcémie mg p.100	Phosphatémie mg p.100
12570	S.C.	0	$9,57 \pm 0,14^*$	$9,10 \pm 0,28$
		5	$8,87 \pm 0,14$	$7,24 \pm 0,13$
		15	$7,69 \pm 0,18$	$6,40 \pm 0,33$
21671	I.V.	0	$10,70 \pm 0,45$	$9,65 \pm 0,25$
		1	$10,07 \pm 0,13$	$8,10 \pm 0,45$
		3	$8,75 \pm 0,06$	$7,82 \pm 0,27$

* Chaque chiffre représente la moyenne de 5 rats

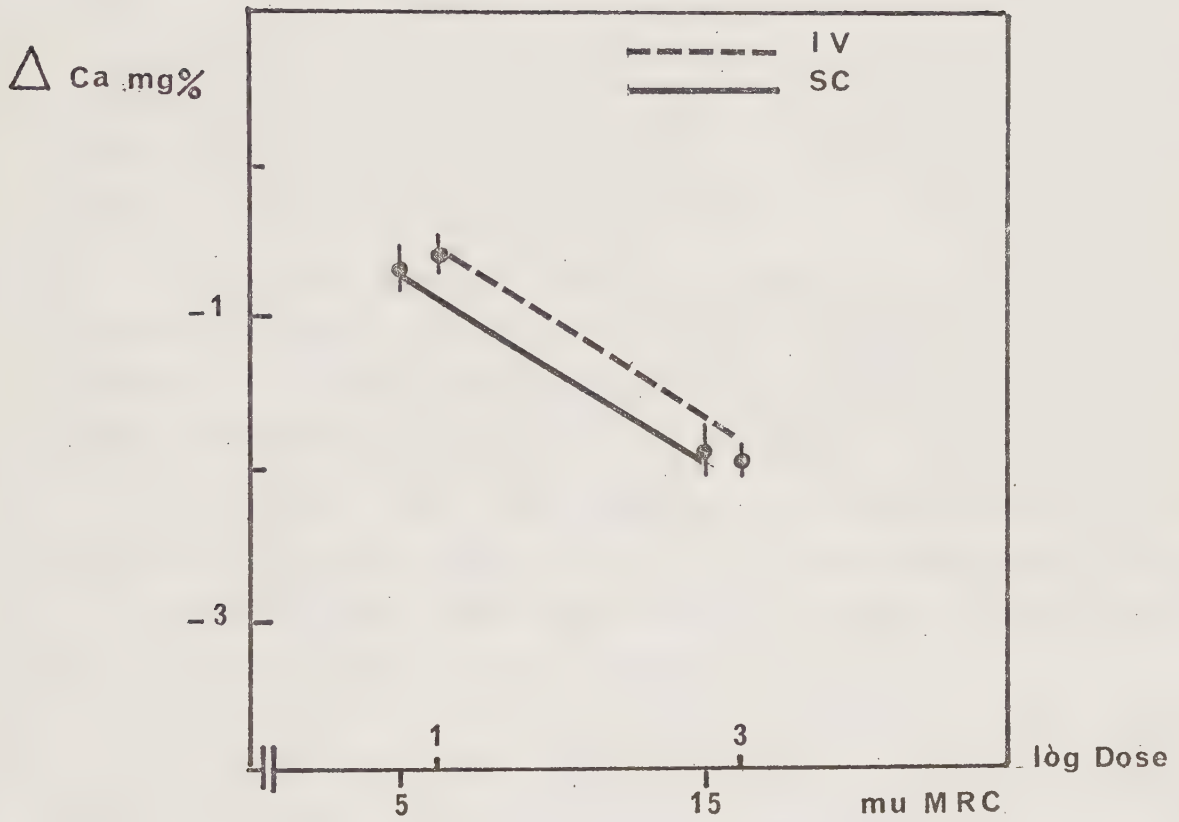


Figure 7 - Comparaison de l'activité hypocalcémiante de la T.C.T. suivant la voie d'injection intraveineuse (I.V.) ou sous-cutanée (S.C.)

(• erreur-type à la moyenne sur 5 animaux)

• Souches de rats

Dans une étude sur l'action de la thyrocalcitonine, CHAUSMER, MITTLEMAN et WALLACH en 1966, ont démontré que le rat de souche Holtzman est plus sensible à l'action hypocalcémiante de la thyrocalcitonine de porc que les Blue Spruce ou les Charles River.

Cette différence dans la sensibilité de ces trois souches : Holtzman, Blue Spruce et Charles Rivers, vis-à-vis de la calcitonine, a incité COOPER en 1968 à en rechercher l'origine. COOPER a démontré que les deux souches les moins sensibles à l'action de la calcitonine, à savoir Blue Spruce et Charles River, possèdent dans leur glande thyroïde une quantité de thyrocalcitonine supérieure à celle de la souche Holtzman.

Nous avons comparé dans nos conditions de laboratoire, la sensibilité des trois souches de rats : Wistar et Sprague Dawley (Masson) et Sprague Dawley (IFFA) à la thyrocalcitonine hautement purifiée 68 MRC/mg, à la dose de 10 mU MRC (Tableau XXVII).

Le tableau XXVII nous indique que l'hypocalcémie et l'hypophosphatémie obtenues après l'injection de 10 mU MRC/rat de thyrocalcitonine sont plus importantes chez les rats Sprague Dawley (Masson) et (IFFA) que chez le rat Wistar.

Nous avons tenté d'expliquer cette différence de sensibilité par la teneur respective (en calcitonine) des thyroïdes de ces rats. Nous avons comparé les rats Sprague Dawley et Wistar (Masson).

Les thyroïdes sont prélevées chez des rats au sevrage, après avoir retiré les parathyroïdes, les glandes sont broyées immédiatement dans l'acide chlorhydrique 0,2 N glacé. L'activité de l'extrait est déterminée par un essai biologique en deux points. L'étalon est la thyrocalcitonine porcine purifiée. Nous avons tout d'abord déterminé la teneur en calcitonine des glandes thyroïdes de chaque souche sur les rats de même souche; ensuite nous avons dosé la teneur en thyrocalcitonine de glandes Wistar sur Sprague Dawley et inversement de glandes Sprague Dawley sur Wistar (voir tableau XXVIII et figures 8a, 8b et 9a, 9b).

TABLEAU XXVII

Comparaison de l'activité hypocalcémiante et hypophosphatémiante de 10 mU MRC/rat de thyrocalcitonine porcine hautement purifiée sur différentes souches de rats Sprague Dawley et Wistar (Masson) et Sprague Dawley (Injection sous-cutanée)

Exp. N°	Souches de rats	Ca mg p.100 après TCT mU MRC/rat			P mg p.100 après TCT mU MRC/rat		
		0	10 mU	variation	0	10 mU	variation
11 570	W (Masson)	9,43* ±0,14	8,05 ±0,29	-1,38	8,90 ±0,15	7,92 ±0,30	-0,98
15 670	W "	9,90 ±0,14	8,56 ±0,39	-1,34	8,20 ±0,22	8,28 ±0,39	-0,08
20 670	W "	9,79 ±0,09	8,03 ±0,16	-1,76	9,60 ±0,24	8,52 ±0,19	-1,08
12 570	SD (Masson)	9,57 ±0,14	7,74 ±0,26	-1,83	9,10 ±0,28	6,96 ±0,31	-2,14
14 670	SD "	10,52 ±0,08	7,60 ±0,31	-2,92	8,94 ±0,14	6,92 ±0,17	-2,02
18 670	SD "	10,40 ±0,20	8,52 ±0,09	-1,88	9,64 ±0,23	7,80 ±0,20	-1,84
13 570	SD (IFFA)	9,96 ±0,12	7,51 ±0,16	-2,45	9,24 ±0,28	6,96 ±0,10	-2,28
16 670	SD "	10,05 ±0,13	7,60 ±0,19	-2,45	10,24 ±0,24	7,26 ±0,15	-2,98
19 670	SD	9,31 ±0,17	7,38 ±0,13	-1,93	9,48 0,00	8,57 ±0,07	-0,91

* Chaque chiffre représente la moyenne de 5 rats

Δ Ca mg%

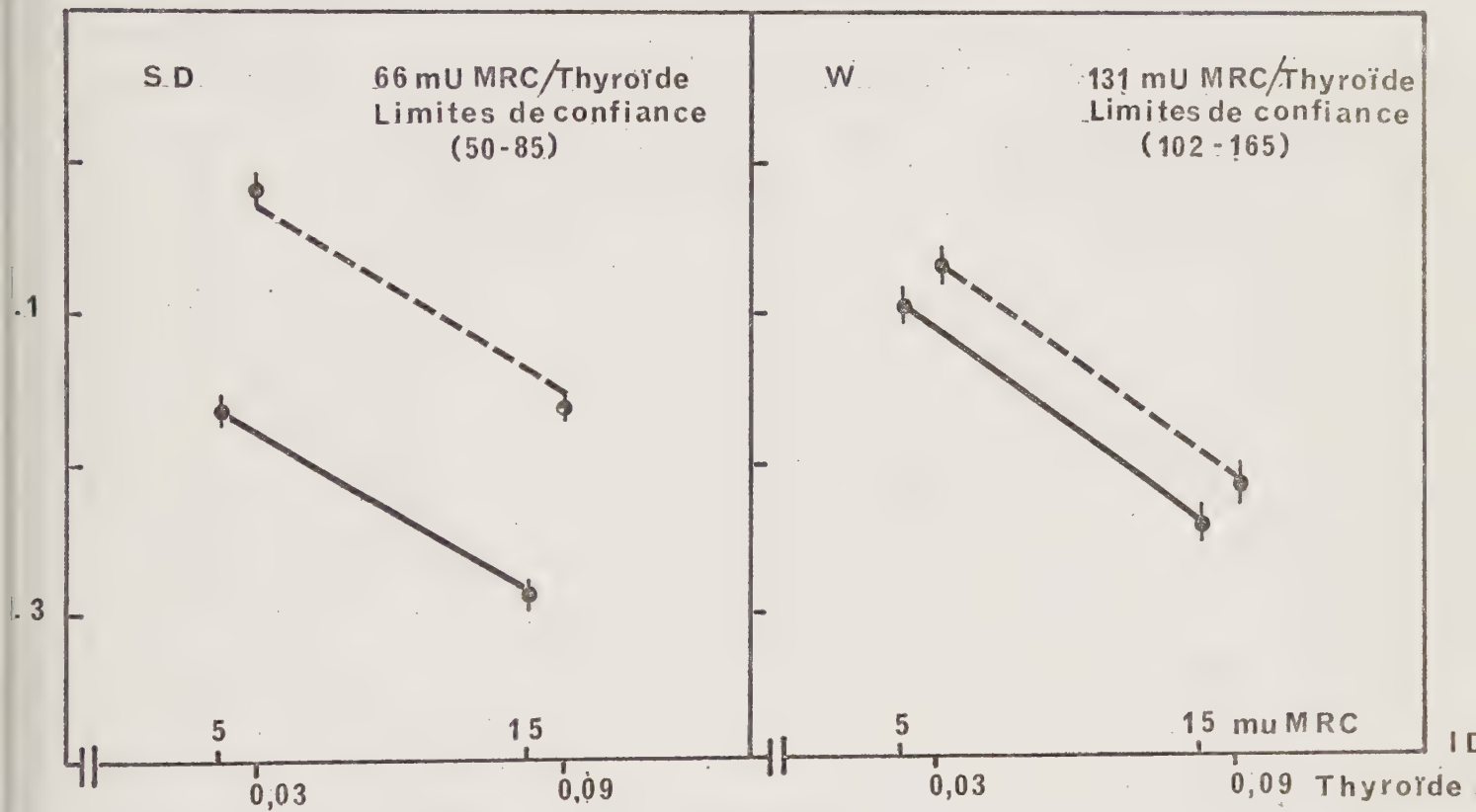


Figure 8a - Titrage de la calcitonine de thyroïde de rat S.D. sur des rats S.D.

----- extrait thyroïdien
 ——— T.C.T. étalon

Figure 8b - Titrage de la calcitonine de thyroïde de rat W sur des rats W.

----- extrait thyroïdien
 ——— T.C.T. étalon

(•) erreur-type à la moyenne sur 5 animaux)

1D log-dose

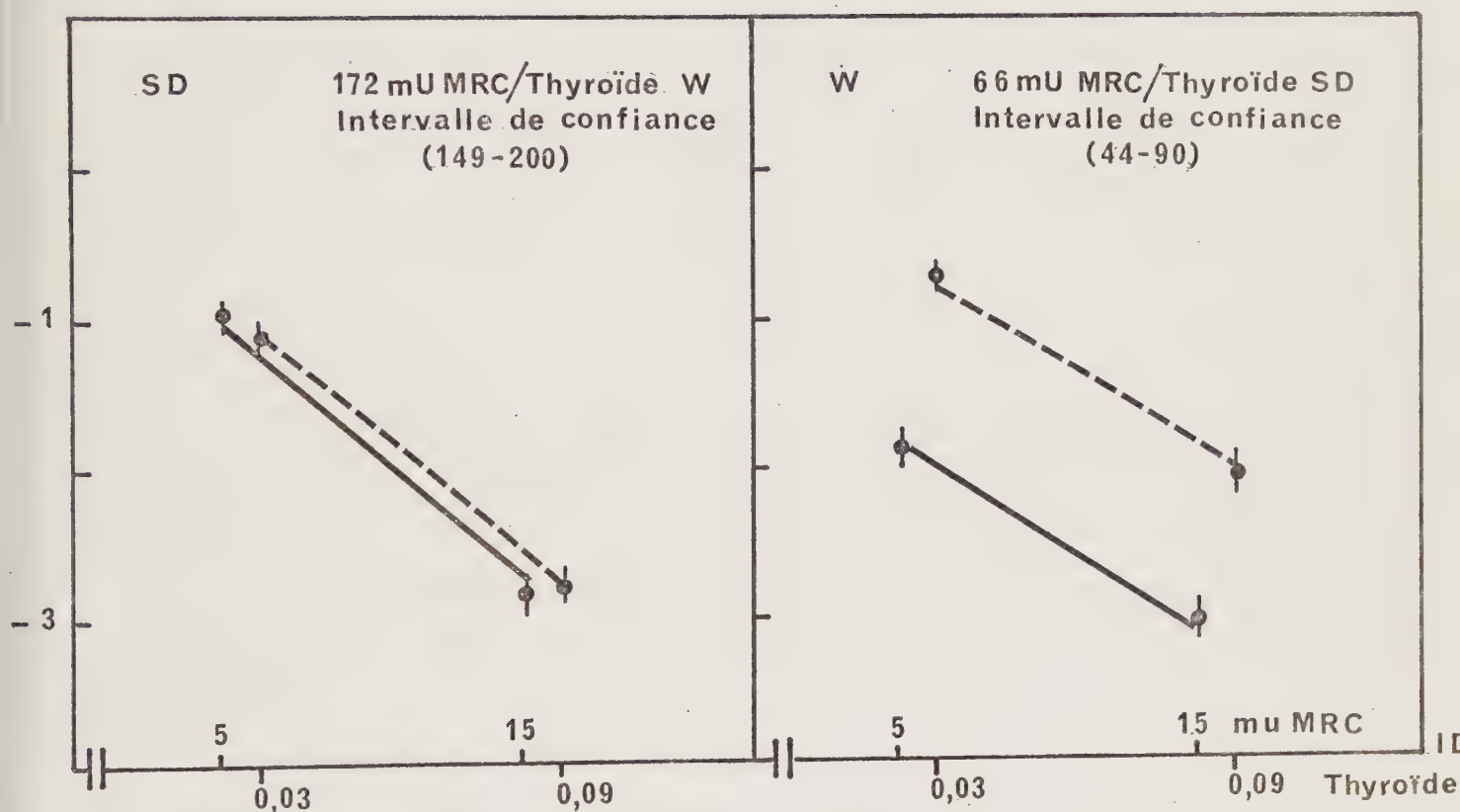
Δ CA mg%

Figure 9a - Titration de la calcitonine de rats Wistar (W) sur des rats Sprague Dawley (S.D.).

----- extrait thyroïdien
—— étalon (T.C.T.)

Figure 9b - Titration de la calcitonine de thyroïdes de rats Sprague Dawley (S.D.) sur des rats Wistar (W).

----- extrait thyroïdien
—— étalon (T.C.T.)

(● erreur-type à la moyenne sur 5 animaux)

1D log-dose

TABLEAU XXVIII

Comparaison de la teneur en thyrocalcitonine des glandes thyroïdes de deux souches de rats Sprague Dawley (SD) et Wistar (W) (Injection sous-cutanée)

Exp. N°	Origine des gl. thyroïd.	Souche de rats utilisée pour l'essai biologiq.	Teneur en TCT mU MRC/glande	Limites de confiance mU MRC	Pente combinée bc	Index de précision λ
67a 1270	SD	SD	66	50-85	- 3,06	0,09
68b 1270	SD	W	66	44-90	- 2,58	0,12
67b 1270	W	W	131	102-165	- 3,05	0,10
68a 1270	W	SD	172	149-200	- 3,65	0,06

Nous constatons que la teneur en calcitonine de glandes thyroïdes de rats Sprague Dawley est plus faible que celle des rats Wistar quelle que soit la souche de rats servant au titrage.

Les rats dont la réserve en calcitonine est la plus forte (150 mU MRC) sont les moins sensibles à l'action de la calcitonine exogène.

En conclusion, les rats Sprague Dawley au sevrage sont plus sensibles à l'action de la thyrocalcitonine porcine que les rats Wistar au sevrage. La teneur en calcitonine de la thyroïde de ces derniers est supérieure à celle de la souche Sprague Dawley.

• Age des animaux

MILHAUD et coll. (1967) ont étudié l'action de la TCT en fonction de l'âge du rat (71 à 325 jours). Il en résulte que l'effet hypocalcémiant et hypophosphatémiant de l'hormone est important chez l'animal en pleine croissance et faible chez l'adulte. Ceci est relié au catabolisme osseux de l'animal. COPP et KUCZERPA (1968)

ont observé une baisse de l'activité de la TCT avec l'augmentation de l'âge du rat. Des résultats semblables ont été obtenus avec des rats âgés de 4 à 12 semaines (PHILIPPO et HINDE, 1968). STURTRIDGE et KUMAR (1968) dans un essai biologique, démontrent que la même hypocalcémie produite chez des rats âgés respectivement de 3 et de 6 semaines, nécessite moins de calcitonine chez ces derniers. Dans une étude récente SERENSEN et coll. (1970) constatent que l'action hypocalcémiante de la TCT est plus prononcée chez les rats âgés de moins de 10 semaines.

Nous avons comparé la sensibilité à la calcitonine des rats Sprague Dawley. Les doses sont les suivantes :

rats de 3 semaines : 7 et 21 mU MRC/rat

rats de 5 semaines : 15 et 45 mU MRC/rat

Les prélèvements de sang sont faits une heure après l'injection sous-cutanée de l'hormone. Les résultats de six expériences sont présentés dans le tableau XXIX.

Nos résultats montrent qu'il faut environ deux fois plus de calcitonine chez les rats de 5 semaines que chez ceux de 3 semaines pour obtenir la même baisse de calcium ou de phosphate sériques. Le poids de l'animal étant environ le double, nous pouvons conclure que dans ce court laps de temps, la sensibilité absolue des animaux n'est pas différente. Cette observation souligne néanmoins que pour utiliser le rat pour le titrage de la calcitonine dans des milieux biologiques, il est préférable d'utiliser le rat au sevrage.

. Discussion

La thyrocalcitonine injectée par voie sous-cutanée en solution acétique est beaucoup moins active (dans la même échelle de dose) que si elle est accompagnée de gélatine. PARSONS a montré que

TABLEAU XXIX

Comparaison de la sensibilité de rats Sprague Dawley
de 3 ou 5 semaines à différentes doses de Thyrocalcitonine

Exp. N°	Age Semaines	Ca mg.p.100 après TCT mU MRC/rat			P mg p.100 après TCT mU MRC/rat		
		0	7	21	0	7	21
24670	3	10,90* ± 0,12	10,63 ± 0,11	8,26 ± 0,25	8,77 ± 0,19	8,48 ± 0,24	7,64 ± 0,17
25670	3	10,25 ± 0,20	10,35 ± 0,19	9,10 ± 0,25	8,52 ± 0,18	7,94 ± 0,12	6,78 ± 0,19
29770	3	9,93 ± 0,05	9,29 ± 0,03	7,37 ± 0,29	9,40 ± 0,34	7,92 ± 0,15	7,22 ± 0,18
		0	15	45	0	15	45
38970	5	10,43 ± 0,18	10,38 ± 0,04	9,19 ± 0,26	8,80 ± 0,52	8,24 ± 0,24	6,80 ± 0,31
40970	5	11,25 ± 0,06	10,19 ± 0,12	8,80 ± 0,28	8,06 ± 0,15	7,44 ± 0,22	7,38 ± 0,15
42970	5	10,84 ± 0,06	10,28 ± 0,09	9,21 ± 0,14	9,18 ± 0,21	8,16 ± 0,20	7,88 ± 0,07

* Chaque chiffre représente la moyenne de 5 rats

l'activité biologique de certaines préparations de calcitonine est apparemment quatre fois plus élevée en présence d'albumine. Cet effet potentialisateur a été attribué à une inhibition de l'adsorption sur la surface du verre du flacon. Il n'est cependant pas exclu qu'il y ait aussi une protection in vivo : chez le lapin l'intensité et la durée de la réponse hypocalcémiante à la calcitonine sont augmentées de façon significative par la gélatine (ALDRED, CLEMENTS, SCHLUETER et coll., 1968).

Il faut signaler que par voie veineuse nous avons obtenu une activité biologique avec des doses de 1 à 5 mMRC/rat en solution dans l'acétate de Na. Il nous paraît donc plus probable que la gélatine agisse, dans le cas des injections sous-cutanées, par protection in vivo et non in vitro dans le flacon, car dans cette dernière hypothèse, nous n'aurions jamais dû observer d'activité avec des solutions aqueuses diluées dans des flacons de verre. Le degré de purification des préparations que nous avons utilisées est assez important : 68 MRC/mg et les solutions sont préparées extemporanément et diluées à une concentration de 50 à 100 mMRC/ml en présence de gélatine.

En 30 minutes ou 1 heure, la calcitonine injectée par voie intraveineuse est environ 5 fois plus active que par voie sous-cutanée sur des rats au sevrage. Par ailleurs, la même hypocalcémie est obtenue avec deux fois moins d'hormone sur des rats au sevrage que sur des rats de 5 semaines. Ces deux facteurs : voie veineuse et âge sont à retenir favorablement dans le cadre d'un titrage biologique de la calcitonine sur le rat.

La sensibilité varie également suivant la souche des rats : la souche Sprague Dawley est la plus sensible dans nos conditions expérimentales; les thyroïdes de ces animaux sont moins riches en calcitonine endogène, ce qui pourrait expliquer une saturation moins grande de l'animal qui réagirait lors du dosage, plus intensément à une augmentation de la calcitonine circulante.

C H A P I T R E I I

ACTION DE LA THYROCALCITONINE (TCT) SUR LE RAT THYROPARATHYROIDECTOMISE

En l'absence du contrôle normal de la calcémie par la parathormone et par la calcitonine, c'est-à-dire chez le rat thyro-parathyroïdectomisé, nous allons étudier les réactions à la calcitonine exogène. Nous aborderons également le cas des animaux opérés traités par la thyroxine pour compenser l'absence d'hormone thyroïdienne ou par la vitamine D pour ramener la calcémie à un taux voisin de la normale.

. Expérimentation

Nous utilisons des rats mâles Sprague Dawley au sevrage (pesant 40 à 50g) nourris avec un régime standard Ratigène. Ces rats sont thyro-parathyroïdectomisés par excision sous loupe stéréoscopique. Les animaux choisis au hasard, sont groupés par 5 et mis à la diète hydrique 16 à 18h avant l'injection intraveineuse de TCT (veine latérale de la queue). Le groupe témoin ne reçoit que le solvant (solution d'acétate de Na).

. Vitamine D

Le cholecalciférol est dissous dans une petite quantité d'alcool éthylique sans peroxyde. La vitamine D ainsi préparée est dissoute dans l'huile d'arachide neutralisée et administrée au rat par voie orale. Nous indiquerons pour chaque expérience la quantité ingérée par rat.

. T.C.T.

Nous utiliserons un échantillon de calcitonine porcine Ky 12.001, lot 489, titrée à 9 MRC/mg. Le solvant utilisé est un tampon acétate de Na à pH 4,6.

. Résultats

1) Action de la TCT sur le rat thyroparathyroïdectomisé (ThPx) recevant de la vitamine D à dose normale

Etude cinétique après injection d'une mU MRC/rat de TCT
.....

Nous avons injecté 1 mU MRC/rat, sur des animaux thyroparathyroïdectomisés depuis deux jours et nous avons déterminé le calcium et le phosphate sériques, 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures après injection de l'hormone. Les résultats sont exposés dans le tableau XXX. Les animaux opérés témoins ont une calcémie basse et un taux de phosphate élevé, signe de l'absence de parathyroïdes. Nous obtenons la baisse maximale de la calcémie au bout de 30 minutes ou une heure après l'injection de TCT. Il n'y a pas de variation significative du phosphate sérique.

TABLEAU XXX

Comparaison de l'activité de 1 mU MRC de thyrocalcitonine
sur le calcium et le phosphate sériques du rat ThPx
en fonction du temps (5 animaux/groupe)

Exp. N°	Sérum mg %	Témoins	Temps en heures			
			1/2	1	2	3
71171	Ca	5,31 ± 0,26	4,39* ± 0,12	4,59* ± 0,07	5,35 ± 0,15	5,04 ± 0,11
	P	13,97 ± 0,33	14,42 ± 0,73	13,8 ± 0,51	14,00 ± 1,2	15,76 ± 0,94

* p < 0,02 par rapport aux témoins

Action de la thyroxine

.....

Nous avons administré pendant deux jours, par voie sous-cutanée, 50µg de DL thyroxine par jour aux rats thyroparathyroïdectomisés; la dernière injection est pratiquée 18 heures avant l'expérience. Les données sont présentées dans le tableau XXXI. L'administration de thyroxine chez le rat thyroparathyroïdectomisé ne potentialise pas l'hypocalcémie provoquée par 0,9 mU MRC/rat. Ici encore, la TCT n'abaisse pas le phosphate sérique dans ces conditions expérimentales : rat thyroparathyroïdectomisé, TCT, intraveineuse avec ou sans supplément de thyroxine.

TABLEAU XXXI

Action de la thyroxine (50µg/jx2) sur l'activité de 0,9 mU MRC/rat de thyrocalcitonine (Ca et P sériques) de rats ThPx 2 jours avant l'expérience

Exp.Nº	Sérum mg%	Rats ThPx			Rats ThPx + 50µg thyroxine / jx 2		
		mU MRC/rat			mU MRC/rat		
83 271	Ca	0	0,9		0	0,9	
		6,58*	5,08	-1,5	5,54	4,88	-0,66
		±0,34	±0,08		±0,16	±0,08	
	P	13,4	12,6	-0,8	15,66	15,20	-0,46
		± 0,7	± 0,95		± 0,18	± 0,40	
84 271	Ca	5,73	5,02	-0,71	5,03	4,40	-0,63
		±0,10	±0,14		±0,16	±0,21	
	P	14,36	13,50	-0,86	18,32	16,58	-1,74
		± 0,26	± 0,45		± 0,66	± 1,11	

* moyenne de 5 rats

2) Action de la TCT sur des rats thyroparathyroïdectomisés recevant la vitamine D à doses pharmacologiques

Nous avons administré aux rats immédiatement après l'ablation des parathyroïdes et de la thyroïde des doses croissantes de vitamine D allant de 50 à 400µg par jour pendant deux jours. Ces

animaux étaient nourris normalement avec le régime standard et ont été mis à la diète hydrique 16 à 18h avant l'expérience. Les résultats sont présentés dans le tableau XXXII et la figure 10. La calcémie croît parallèlement à la dose de vitamine D et la baisse du phosphate sérique n'apparaît qu'à partir de 200µg par jour.

TABLEAU XXXII

Action de doses croissantes de vitamine D µg/jour pendant deux jours sur le calcium et le phosphate sériques de rats (ThPx)

Vitamine D µg/j pendant 2 jours	Sérum	
	Ca	P
	mg %	
	*	
0	± 5,66 ± 0,33	± 13,80 ± 0,27
50	± 6,60 ± 0,25	± 14,50 ± 0,17
100	± 8,62 ± 0,26	± 14,50 ± 0,14
150	± 10,87 ± 0,19	± 13,00 ± 0,61
200	± 10,66 ± 0,44	± 11,77 ± 0,35
400	± 14,04 ± 0,72	± 9,94 ± 0,23

* moyenne de 5 rats

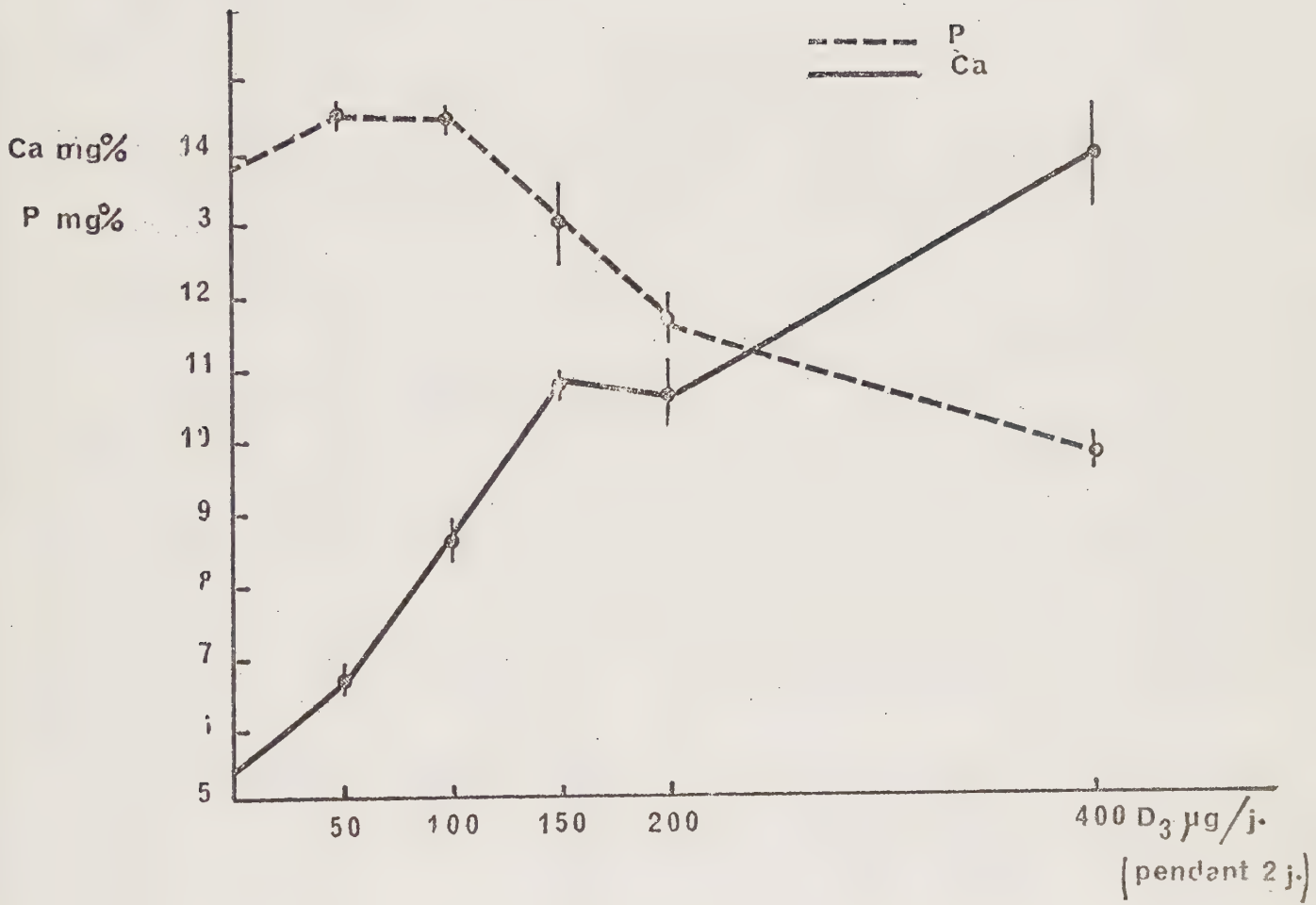


Figure 12 -- Variation de Ca et de P sériques des rats thyroparathyroïdectomisés (ThyX) en fonction de l'ingestion de vitamine D_3 .
 (ϕ erreur-type à la moyenne sur 5 animaux)

Nous avons essayé de déterminer les limites d'activité de la TCT chez le rat thyroparathyroïdectomisé surchargé en vitamine D. Les doses de TCT utilisées sont en progression géométrique : 0,1 , 0,3 et 0,9 mU MRC/rat. Nous avons administré ces doses à des rats recevant 400µg de vitamine D par jour pendant 2 ou 3 jours avant l'expérience. Les données numériques sont exposées dans le tableau XXXIII.

TABLERAU XXXIII

Comparaison de l'activité des doses croissantes de TCT sur le calcium et le phosphate sériques des rats ThPx recevant 400 µg de vitamine D₃ par jour pendant 2 ou 3 jours

N° Expér.	Vitamine D µg/j	TCT mU MRC/rat	Sérum	
			Ca mg %	P
78 171	400µg x 2	0	13,50 ± 0,38	10,56 ± 0,63
		0,1	12,92 ± 0,93	10,38 ± 0,42
		0,3	11,64 ± 0,49	9,02 ± 0,25
		0,9	10,21 ± 0,26	8,34 ± 0,19
81 272	400µg x 2	0	14,04 ± 0,72	9,94 ± 0,23
		0,3	13,52 ± 0,53	11,28 ± 0,81
		0,9	11,79 ± 0,43	9,80 ± 0,24
80 271	400µg x 3	0	16,39 ± 0,24	10,58 ± 0,23
		0,1	16,52 ± 0,25	9,64 ± 0,53
		0,3	15,99 ± 0,30	9,22 ± 0,26
		0,9	14,66 ± 0,38	8,22 ± 0,09

La calcémie très élevée des rats thyroparathyroïdectomisés traités par les doses fortes de vitamine D, est sensible à la TCT, 0,3 mMRC semble la limite inférieure. Le phosphate sérique ramené presque à la normale par ces doses de vitamine D est sensible également à la TCT (2 essais sur 3).

Nous avons diminué la quantité de vitamine D administrée au rat. Nous donnons aussitôt après thyroparathyroïdectomie 200µg 20 heures avant l'expérience ou 200µg par jour pendant 2 jours. Les résultats sont exposés dans le tableau XXXIV. La vitamine D à la dose unique de 200µg ne rétablit pas tout à fait la calcémie d'animaux thyroparathyroïdectomisés et la phosphatémie reste élevée. La TCT abaisse la calcémie pour des doses allant de 0,3 à 0,9µu MRC mais la phosphatémie n'est pas modifiée.

. Discussion

HIRSCH et coll. (1964), MORII et coll. (1967) avaient observé que la TCT agit sur la calcémie des rats sans parathyroïdes, ni thyroïde. Nous confirmons ce point et constatons que la sensibilité de ces rats est accrue par rapport à celle des rats non opérés de même âge malgré le faible taux de calcium sérique (5,5 à 6,5mg p.100). Une hypocalcémie voisine de 1mg p.cent est obtenue après injection intraveineuse de 0,9 mU MRC chez le rat thyroparathyroïdectomisé tandis que chez le rat normal il faut 3 à 5 mU MRC. Par contre, ces mêmes doses n'abaissent pas la phosphatémie bien que celle-ci soit très élevée en l'absence des parathyroïdes.

L'action potentialisatrice de la thyroxine observée par MILHAUD, TSIEN-MING et MOUKHTAR (1967) sur les effets de TCT au niveau du calcium sérique ne peut être mise en évidence dans nos expériences : nous utilisons des rats plus jeunes et une dose plus faible de TCT 0,9 mU MRC. L'activité hyperphosphatémiant de la thyroxine décrite par ces auteurs sur des rats thyroparathyroïdectomisés de 45 jours, se retrouve sur nos rats de 21 jours. Cette action est d'ailleurs très générale puisque PRELOT et coll. (1971) l'ont mise en évidence sur des rats femelles adultes thyroparathyroïdectomisées.

TABLEAU XXXIV

Comparaison de l'activité des doses croissantes de T.C.T. sur le calcium et le phosphate sériques de rats ThPx recevant 200 µg de vitamine D₃ par jour, pendant 1 ou 2 jours.

Exp. Nº	Vitamine D µg/j	T.C.T. mU MRC/rat	Sérum	
			Ca	P
			mg ‰	
82 271	200µg x 2	0	13,67 ± 0,57	11,88 ± 1,02
		0,1	10,93 ± 0,34	10,74 ± 0,58
		0,3	11,18 ± 0,36	11,40 ± 0,14
		0,9	8,54 ± 0,42	10,20 ± 0,23
89 271	200µg x 2	0	10,66 ± 0,44	11,77 ± 0,35
		0,05	10,81 ± 0,25	11,10 ± 0,21
		0,15	10,19 ± 0,25	11,58 ± 0,49
		0,45	8,93 ± 0,51	11,42 ± 0,57
95 371	200µg x 1	0	7,99 ± 0,31	15,30 ± 0,35
		0,1	7,70 ± 0,09	15,92 ± 0,13
		0,3	6,34 ± 0,21	15,92 ± 0,12
		0,9	5,78 ± 0,12	15,24 ± 0,34
96 371	200µg x 1	0	9,04 ± 0,19	13,56 ± 0,21
		0,1	8,58 ± 0,43	13,10 ± 0,26
		0,3	8,21 ± 0,31	12,94 ± 0,64
		0,9	6,69 ± 0,20	15,52 ± 0,70
97 371	200µg x 1	0	9,62 ± 0,58	15,72 ± 0,24
		0,3	7,46 ± 0,32	14,32 ± 0,42
		0,9	6,05 ± 0,20	14,62 ± 0,50

La normalisation de la calcémie par la vitamine D chez le rat thyroparathyroïdectomisé nécessite des quantités beaucoup plus importantes (200 à 300 μ g) que celles nécessaires à maintenir la calcémie d'un rat rachitique (environ 0,025 μ g de vitamine D). Les doses élevées de vitamine D mobilisent le calcium osseux même en l'absence des parathyroïdes (Tableau XXXII) contrairement à l'action de la parathormone qui nécessite la présence de vitamine D. Les doses élevées de calciférol que nous avons administrées aux rats thyroparathyroïdectomisés augmentent de 3 à 4mg p.cent leur calcémie tandis que des mêmes doses n'augmentent que de 0,5 à 1mg p.cent la calcémie des rats normaux, démontrant ainsi l'efficacité de la calcitonine sécrétée par la thyroïde chez ces derniers.

L'élévation de la calcémie due à la vitamine D renforce l'action hypocalcémiante de la TCT : la baisse observée avec 0,9 mU MRC est de l'ordre de 2,5mg p.cent.

Dans nos conditions expérimentales, un fait mérite d'être souligné : la phosphatémie des animaux thyroparathyroïdectomisés diminue avec les doses plus élevées de vitamine D et quand la phosphatémie est voisine de 10mg p.cent, la calcitonine retrouve une action hypophosphatémiante. Néanmoins pour un titrage de l'activité de la thyrocalcitonine, il faudrait utiliser une dose de 200 μ g de vitamine D₃ qui ramène la calcémie à peu près à la normale sans diminuer la phosphatémie. En effet, ceci permet d'éliminer un animal ayant une phosphatémie basse et une calcémie élevée, donc incomplètement opéré ou ayant des parathyroïdes accessoires.

C H A P I T R E I I I

ACTION DE LA THYROCALCITONINE (TCT) SUR LE POULET

Nous allons étudier les effets de la calcitonine bovine ou porcine et de la calcitonine extraite des corps ultimobranchiaux des poulets sur la calcémie du poussin et de la poule pondeuse.

. Poussins

Calcitonine sur le poussin

Les poussins de 1 jour n'ayant pas reçu de nourriture, reçoivent une injection sous-cutanée (1 MRC) de calcitonine diluée dans une solution de gélatine à 1 p.cent pH 3,2 (comme pour les rats). Les variations de la calcémie déterminées sur le sérum prélevé par ponction cardiaque en fonction du temps sont exprimées par le tableau XXXV. A cette dose, en 1 heure, la calcitonine n'a aucune action sur la calcémie des poussins.

A la dose de 8 MRC par poussin, on n'observe pas plus de variation du calcium sérique jusqu'à 5 heures après l'injection (Tableau XXXVI).

TABLEAU XXXV

Action de 1 U MRC de TCT sur la calcémie du poussin de 1 jour
au cours des 60 premières minutes (8 animaux par groupe)

Temps en minutes :	0	5	10	20	30	60
Ca sérique mg p.100	10,8 ± 0,2	10,6 ± 0,2	11,3 ± 0,2	11,0 ± 0,1		
	10,2 ± 0,1				10,7 ± 0,1	10,7 ± 0,2

TABLEAU XXXVI

Action de 8 MRC de TCT sur la calcémie du poussin de 1 jour
en fonction du temps (moyenne de 7 animaux)

Temps en heures	0	1	2	3	4	5
Ca sérique mg p.100	10,5 ± 0,1	10,1 ± 0,1	10,0 ± 0,1	10,1 ± 0,1	10,4 ± 0,1	10,5 ± 0,1

Calcitonine et thyroxine

La DL-thyroxine à la dose de 200µg en injection sous-cutanée n'a pas d'action, en 24 heures, sur la calcémie du poussin et son association avec la calcitonine ne permet pas d'observer une activité de cette dernière sur le calcium ou le phosphate sériques. Nous retrouvons ici, comme chez le rat, une augmentation du phosphate sérique sous l'influence de la thyroxine seule (Tableau XXXVII).

TABLEAU XXXVII

Action de la thyroxine et de la calcitonine
sur le calcium et le phosphate sériques du poussin de 1 jour
(5 animaux par groupe)

Sérum	Témoins	Thyroxine	Thyroxine + TCT 500 mU MRC/poussin
Ca mg %	10,24 $\pm$ 0,092	10,17 $\pm$ 0,195	10,37 $\pm$ 0,181
P mg %	4,88 $\pm$ 0,28	<u>5,82</u> $\pm$ 0,259	<u>6,08</u> $\pm$ 0,217

———— p < 0,05 par rapport aux témoins

Extraits de corps ultimobranchiaux

La teneur élevée en calcitonine des corps ultimobranchiaux des oiseaux, décrite par COPP, COCKROFT et KUEH (1967) nous a conduit à l'extraire à partir des organes de poulets de 3 semaines. Cette préparation active sur la calcémie du rat (baisse de 1,4mg p.cent) est inactive sur celle du poussin de 1 jour (Tableau XXXVIII).

TABLEAU XXXVIII

Action de la calcitonine des corps ultimobranchiaux
sur la calcémie du poussin de 1 jour

	Temps en heures					Activité sur la calcémie du rat
	0	1/2	1	2	3	
Ca sérique mg p.100	9,9 [*] ±0,2	9,9 [*] ±0,2	10,2 [*] ± 0,2	10,0 ± 0,2	10,1 ± 0,2	-1,4
	9,4 ^{**} ±0,1		9,4 ^{**} ±0,1			-1,6

* 7 animaux par groupe

** 8 animaux par groupe

• Poule pondeuse

Calcitonine
.....

La calcémie de la poule en période de ponte est très élevée : 15 à 35mg p.cent (HUGUES,TITUS,SMITS,1927). Nous avons étudié sur ces animaux les effets de la TCT bovine. A la dose de 0,5 ou de 1 MRC, la calcitonine n'a pas d'action significative sur la calcémie ou la phosphatémie (Tableau XXXIX) de ces animaux; les variations dues à la seule injection du solvant sont de même amplitude en 1 heure que celles observées après injection de solvant + calcitonine.

TABLEAU XXXIX

Action de la calcitonine sur le calcium et le phosphate sériques de la poule pondeuse.

	0	0,5 MRC	1 MRC	
Ca mg p.100	-1,06* $\pm$ 0,39	-1,45 $\pm$ 0,26	-0,6 $\pm$ 0,46	N.S.
P mg p.100	-0,46 $\pm$ 0,25	-0,46 $\pm$ 0,24	-0,43 $\pm$ 0,31	N.S.

* Moyenne de 6 poulets

. Discussion

La calcitonine exogène d'origine bovine n'a pas d'activité décelable sur le calcium et le phosphate sériques du poussin. L'hypothèse d'une résistance due à l'origine de l'hormone est à éliminer puisque la préparation faite à partir des corps ultimobranchiaux de poulets bien qu'hypocalcémiant sur le rat, est inactive sur le poussin. La thyroxine n'a pas d'action potentialisatrice des effets de la calcitonine sur le poussin, bien qu'elle élève par elle-même le niveau du phosphate sérique.

Le cycle de la ponte qui s'accompagne d'une forte mobilisation du calcium se traduisant par un taux de calcium circulant 3 à 4 fois supérieur au taux normal n'est pas modifié par la calcitonine. Le cycle calcique, en particulier la formation d'os médullaire, est lié à la présence des oestrogènes qui provoquent une rétention calcique et phosphorée (CLAVERT et BENOIT, 1942 et TAYLOR et STRINGER, 1965). Le rôle physiologique de la calcitonine chez l'oiseau est encore mal connu.

En l'absence des parathyroïdes, on observe une certaine activité hypocalcémiante de la calcitonine bovine ou aviaire chez le coq (KRAINTZ et INTSCHER, 1969).

Par ailleurs, l'ablation des corps ultimobranchiaux n'a pas d'effet direct sur le développement du squelette du poulet mais une surcharge calcique chez ces animaux a un effet plus durable (BROWN et coll., 1969).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'étude systématique de divers paramètres nutritionnels et endocriniens intervenant dans la régulation du métabolisme calcique permet en tout cas de souligner la complexité du problème, même limité au rat et au poulet.

L'âge, l'équilibre et le niveau phosphocalcique du régime, la vitamine D, la souche font varier la sensibilité du rat à l'action hypercalcémiant de la parathormone dans des limites très larges allant de l'absence totale d'activité à une hypercalcémie de + 2,8mg p.cent pour un rat de 6 semaines recevant 100 USP de parathormone et de + 4mg p.cent pour un rat Wistar au sevrage thyroparathyroïdectomisé par excision recevant 20 USP de parathormone. GAREL (1969) a obtenu une hypercalcémie de + 2,5mg pour 1 USP sur le rat nouveau-né (3 jours) non opéré.

La parathyroïdectomie seule ou associée à la thyroïdectomie n'a pas les mêmes conséquences sur la cinétique de variation de la calcémie ou de la phosphatémie après injection de PTH, en particulier la capacité de la thyroïde à sécréter de la calcitonine sous l'influence de l'hypercalcémie peut varier d'une souche de rat à l'autre. Il faut également souligner que d'autres facteurs peuvent provoquer cette sécrétion : le glucagon par exemple (AVIOLI et coll., 1969) et faire intervenir la durée du jeûne précédant la parathyroïdectomie.

Le poussin de 1 jour est sensible à l'action hypercalcémiante de la parathormone 2,5mg p.cent pour 20 U USP mais ne répond pas à la calcitonine d'origine bovine ou même ultimobranchiale. Cette particularité permet de préconiser le poussin de 1 jour comme animal test de l'activité parathyroïdienne puisqu'il ne nécessite pas d'opération préalable et que le prélèvement sanguin est relativement facile.

Les expériences concernant la calcitonine soulignent également l'importance de l'âge, de la souche de rats pour la réponse hypocalcémiante et hypophosphatémiante. En l'absence du contrôle hormonal physiologique : parathyroïdes et thyroïde, les doses excessives de vitamine D agissent sur le squelette et entraînent la mobilisation minérale de l'os (NICOLAYSEN et EEG-LARSEN, 1953), l'augmentation de la calcémie de ces rats permet de mettre en évidence une sensibilité accrue à l'action hypocalcémiante de la calcitonine.

Nos résultats sur l'activité physiologique de la parathormone et de la calcitonine, nous permettent de conclure que l'action de ces hormones est très importante sur les rats jeunes, la parathormone étant seule active sur le poussin qui est insensible à la calcitonine. Nos observations soulignent, par ailleurs, les difficultés théoriques auxquelles se heurte la définition d'une unité biologique d'activité de la parathormone comme de la calcitonine, en particulier sur le rat. Pour ces raisons, nous proposons (annexes I et II) un test de titrage d'activité biologique comparée à celle d'un étalon titré sur le chien pour la parathormone et sur le rat pour la calcitonine.

ANNEXES

A N N E X E I

I- TITRAGE DE LA PARATHORMONE SUR LE RAT

La parathormone est dosée par la mesure de son action hypercalcémiant sur le rat thyroparathyroïdectomisé par rapport à l'activité d'une hormone étalon de référence préalablement titrée sur le chien suivant les normes décrites par la Pharmacopée française, VIIIème édition, p.1078.

Conditions d'application

Le titrage ne peut être pratiqué que dans une zone d'activité où l'équation de régression : hypercalcémie, logarithme de la dose est linéaire. Chaque titrage doit être effectué comparativement à un étalon, la comparaison étant d'autant plus satisfaisante que les doses injectées de l'hormone étalon et de l'hormone inconnue seront d'activité voisine. Avant le dosage définitif, on pratique donc un ou deux essais indicatifs, pour déterminer les doses approximatives de l'hormone à titrer, afin que l'activité soit aussi voisine que possible de celle de l'hormone étalon utilisée.

Animaux

Prendre des rats Wistar mâles au sevrage, pesant entre 40 et 50g mis à la diète hydrique 16 heures avant le début du dosage. Thyroparathyroïdectomisez ces animaux anesthésiés par inhalation d'un mélange éther-chloroforme 9 vol.-1 vol. en disséquant à la pince

sous la loupe binoculaire l'appareil thyro-parathyroïdien qui est retiré en totalité; la ligature des artères thyroïdiennes n'est pas nécessaire. Injectez aussitôt, par voie sous-cutanée, soit la solution isotonique de chlorure de sodium, soit les dilutions de la parathormone étalon, soit celles de la préparation à titrer. Prélevez le sang sans anticoagulant, soit par ponction cardiaque, soit par section de la jugulaire après anesthésie à l'éther-chloroforme 6 heures après l'injection.

En fonction des conditions statistiques adoptées, chaque série est répartie soit en 7 groupes de 6 animaux : 1 pour le sérum physiologique, 3 pour l'étalon (rapports 1, 2 et 4), 3 pour la préparation à doser (essai en 3 points); soit en 5 groupes de 7 à 8 animaux : 1 pour le sérum physiologique, 2 pour l'étalon (rapports 1,2) 2 pour la préparation à doser (rapports 1,2) (essai en 2 points).

Solution

Pour l'étalon, faire trois solutions (essai en 3 points) ou deux solutions (essai en 2 points) dans le sérum physiologique telles que 0,4ml contiennent 5, 10, 20 USP (ou 5, 10 ou 10, 20 USP). Pour le produit à doser, préparer trois (ou 2) solutions dans les conditions identiques.

Dosage du calcium sérique

Séparez le sérum après coagulation spontanée par centrifugation. Dosez le calcium sérique soit par complexométrie, soit par spectrophotométrie d'absorption atomique.

Complexométrie

Mesurez 0,2ml de sérum dans une petite capsule de porcelaine de 40mm de diamètre, ajoutez 1 ml de complexon M/1000 (complexon III à 2 H₂O 372mg pour 100ml H₂O distillée); mélangez à l'aide d'un petit agitateur, attendez une minute, ajoutez 1 ml de NaOH N, attendez 30 secondes.

Introduisez 1 à 2mg environ de mélange indicateur (calcéine 80mg, thymol-phtaléine 60mg, chlorure de sodium 10g) avec la pointe d'un vaccinostyle. Attendez la dissolution complète (30 secondes environ). Versez goutte à goutte à l'aide d'une microburette la solution étalon de calcium (4mg p.cent, soit M/1000) jusqu'à virage du violet au vert; soit n_1 ml le volume de solution de calcium employé.

Titrez la solution de complexon en opérant comme précédemment mais sans addition de sérum. Soit n ml le volume de solution de Ca employé.

Le taux de calcium sérique est $(n - n_1) \times 20$ exprimé en mg pour 100ml.

Spectrophotométrie d'absorption atomique

Prenez 0,2ml de sérum, complétez à 5ml avec une solution contenant 8,82g de chlorure de lanthane (La 5g), 100 ml HCl (N), H₂O distillée q.s.p. 500ml, mélangez. Reprenez avec la même solution de chlorure de lanthane une gamme étalon de Ca correspondant à des teneurs en calcium de 4, 6, 8, 10, 12 et 15mg/100ml de sérum (solution de calcium étalon à 10 mg p.cent; 0,4; 0,6; 0,8, 1; 1,2 et 1,5ml. Complétez à 25ml avec la solution de chlorure de lanthane.

Mesurez l'absorption des solutions au spectrophotomètre équipé d'une lampe à cathode de calcium, avec une flamme air-acétylène.

Tracez sur une feuille de papier millimétré la courbe : concentration en calcium des solutions étalon (abscisses) - absorbances (ordonnées).

Reportez sur cette courbe les absorbances des sérums à doser pour en déduire leur concentration en calcium.

Calcul des résultats

Calculez la moyenne du taux de calcium sérique (mg p.cent) des rats témoins thyroparathyroïdectomisés ayant reçu le sérum physiologique. Ce chiffre doit être inférieur à $7,5 \pm 0,5$ mg/Ca p.cent ou inférieur à 80 p.cent de la calcémie des animaux non opérés. Dans ce cas, on procède à l'analyse statistique suivant la Pharmacopée, VIIIème édition, 1965, p.1635-1636, essai factoriel "log-dose réponse 2,2" ou par toute autre méthode statistique.

Exemple : Essai en 2 points (rapport 1/2)

1^o- Ca sérique des rats thyroparathyroïdectomisés :

6,8 : 6,6 ; 7,9 ; 8,8 ; 7,4 ; 7,3 ; 6,9 ; moyenne 7,4 p.100
(valable)

2^o- Calcémie des animaux traités et analyse statistique :

	Etalon PTH (USP)		Extrait parathyroïdien	
	5	10	0,18ml	0,36ml
	9,8	11,1	10,8	9,8
	10,3	9,4	9,7	11,5
	9,2	12,2	9,3	9,7
	10,1	11,6	9,7	9,2
	8,9	12,7	7,8	11,7
	10,4	9,4	8,4	11,7
	9,4	12,1	9,4	11,0
T _d	68,1	78,5	65,1	74,6
R	1,5	3,3	3,0	2,5
a	-1	-1	+1	+1
b	-1	+1	-1	+1
ab	+1	-1	-1	+1
T _a =	(-68,1)	+ (-78,5)	+ (+65,1)	+ (+ 74,6) = -6,9
T _b =	(-68,1)	+ (+78,5)	+ (-65,1)	+ (+ 74,6) = +19,9
T _{ab} =	(+68,1)	+ (-78,5)	+ (-65,1)	+ (+ 74,6) = - 0,9

T_d = Total des réponses pour chaque dose

R = étendue des réponses par dose, c'est-à-dire écart maximum entre les réponses à chaque dose.

a, b, ab : coefficients donnés par le tableau III, Pharmacopée VIII, p.1811

T_a, T_b, T_{ab} : sont obtenus en additionnant les produits de T_d par les coefficients correspondants a, b, ab.

Validité du dosage

Les conditions suivantes doivent être remplies :

1°. Différence étalon échantillon

$$T_a \leq t_a \sum R$$

t_a pour 7 animaux par dose,
essai 2,2 = 1,01

Tab.IV, Pharmacopée VIII, p.1812

$$t_a \sum R = 1,01 \times 10,3 = 10,403$$

$$T_a = -6,9$$

essai valable (inférieur à 10,403)

2°. Pente combinée

$$T_b > t_b \sum R$$

t_b cf.Tab.IV, loc.cit. = 1,01

$$t_b \sum R = 1,01 \times 10,3 = 10,403$$

$$T_b = +19,9$$

essai valable (supérieur à 10,403)

3°. Parallélisme des courbes

$$T_{ab} < t_{ab} \sum R$$

t_{ab} cf.Tab.IV, loc.cit. = 1,01

$$t_{ab} \sum R = 1,01 \times 10,3 = 10,403$$

$$T_{ab} = -0,9$$

inférieur à 10,403 : les courbes
sont parallèles

$$\text{pente } b = T_b / 2 \text{ i n} (*)$$

doit être supérieure à 3;

$$b = \frac{19,9}{2 \times 0,301 \times 7} = 4,722$$

i : logarithme du rapport des
doses soit $\log 2 = 0,301$;

n : nombre de réponses par dose

Logarithme de l'activité relative M'

$$M' = c \text{ i } T_a / T_b$$

c = 1 cf.Tab.Pharmacopée VIII,
p.1814

$$M' = 0,301 \times \frac{-6,9}{19,9} = -0,1043 \quad \bar{1},8957$$

Le nombre correspondant est 0,786 (78,6 %)

Le titre en USP de l'extrait de parathyroïdes est :

$$10 \times \frac{78,6}{100} \times \frac{1}{0,36} = 21,83 \text{ USP/ml}$$

Limites de confiance de l'activité relative

$$C M' \pm \sqrt{(C-1) (CM'^2 + c'i^2)}$$

$$C = T_b^2 / T_d^2 - e_b n s^2 t^2$$

$$e_b = 4 \text{ cf. Tab.III, Pharmacopée VIII, p.1811}$$

$$n = \text{nombre de réponses par dose} = 7$$

$$s^2 = (\sum y^2 - \sum T_d^2 / n) / \sum n - k$$

$$y = \text{chaque réponse}$$

$$k = \text{nombre de doses de l'échantillon} + \text{nombre de doses de doses de l'étalon} = 4$$

$$t^2 = 4,26 \text{ cf. Tab.I, Pharmacopée VIII, p.1809, correspondant à } \sum n - k \text{ soit à } (4 \times 7) - (4) = 24$$

$$c' = 1 \text{ cf. Tab.V, loc.cit.}$$

$$s^2 = \frac{2968,41 - 2943,29}{24} = 1,0466$$

$$C = \frac{396,01}{396,01 - (4 \times 7 \times 1,0466 \times 4,26)} = 1,46$$

$$M' = -0,1043$$

$$\pm \sqrt{(C-1) (CM'^2 + c'i^2)} = \pm \sqrt{(1,46) [1,46 \times (0,1043)^2 + (0,301)^2]}$$

$$\pm \sqrt{0,048898} = \pm 0,2209$$

Les logarithmes des limites de confiance sont :

$$1,46 \times (-0,1043) \pm 0,2209$$

$$\begin{array}{rcl} - 0,1522 \pm 0,2209 & - 0,3731 & \bar{1},6269 \text{ nombre correspondant } 0,4236 \\ & + 0,0687 & \text{" " " } 1,17 \end{array}$$

Les limites de confiance de l'activité relative de l'échantillon (78,6%) sont de 42,3 à 117%.

Index de précision :

$$\lambda = \frac{S}{b} \text{ doit être inférieur à } 0,3$$

$$\lambda = \frac{\sqrt{1,0466}}{4,722} = 0,21 \text{ (valable)}$$

II - TITRAGE DE LA PARATHORMONE SUR LE POUSSIN

La parathormone est dosée par la mesure de son activité hypercalcémiant sur le poussin de 1 jour par rapport à l'activité d'une hormone étalon de référence titrée sur le chien suivant les normes de la Pharmacopée française VIIIème édition.

Les conditions théoriques d'application du test sont les mêmes que pour le rat.

Animaux

Prendre 35 poussins mâles juste éclos et ne leur donner que de l'eau du robinet jusqu'au lendemain en les gardant dans une pièce éclairée à température voisine de 28°C. Les poussins sont partagés au hasard en 5 groupes. L'étalon et la solution à titrer sont injectés par voie sous-cutanée. La calcémie est déterminée 3 heures plus tard sur le sérum obtenu après coagulation spontanée du sang prélevé par ponction cardiaque.

Préparation de l'étalon

Faire deux solutions dans le sérum physiologique de la parathormone étalon telles que 0,25 ml contiennent 5 et 10 U USP. Pour le produit à doser, préparer deux solutions dans des conditions identiques.

Le dosage du calcium et les calculs statistiques sont identiques à ceux décrits pour le rat.

A N N E X E I I

DOSAGE BIOLOGIQUE DE LA THYROCALCITONINE

La thyrocalcitonine est dosée par la mesure de son activité hypocalcémiante sur le rat par rapport à l'activité d'une hormone étalon de référence titrée en unités MRC (Medical Research Council).

Conditions d'application

La baisse de calcémie mesurée après injection sous-cutanée de 10 μ u MRC de l'hormone étalon doit être voisine de 1mg Ca^{++} pour 100ml sérum pour répondre à la définition de l'unité MRC.

Avant le dosage proprement dit, on pratique un ou plusieurs essais préliminaires pour déterminer les doses de l'hormone à titrer ayant une activité hypocalcémiante aussi voisine que possible de celle de la thyrocalcitonine étalon utilisée

Le titrage pour être valable, ne peut être pratiqué que dans une zone d'activité où l'équation de régression : hypocalcémie / logarithme de la dose est linéaire.

Animaux

Prendre 25 rats mâles au sevrage de poids homogène $\pm 3g$ en bonne santé. Les animaux sont nourris avec un régime normal jusqu'à la veille du test (3-4 jours au maximum).

Ces animaux sont mis à jeun 18 à 20 heures avant l'essai (eau distillée ad libitum pendant cette période).

Les rats sont partagés au hasard en 5 groupes.

Préparation de l'étalon et du produit à titrer

L'étalon et le produit à titrer sont préparés au moment de l'emploi. Faire les dilutions des doses à injecter dans la solution de gélatine dont la composition est la suivante :

Gélatine officinale	1g
ClNa	0,9g
OH ₂ distillée q.s.p.	100ml
HCl q.s.p. pH 3,2	

Cette solution doit être préparée au moment de l'emploi.

Voie d'introduction et volume injecté

- L'administration de l'hormone se fait par voie sous-cutanée.
- Le volume injecté est de 0,25ml par rat quelle que soit la dose.
- Le premier groupe reçoit 0,25ml du solvant par rat.
- Deux groupes reçoivent respectivement deux doses de l'étalon dans le rapport 1 à 3.
- Les deux derniers groupes reçoivent les deux doses de l'hormone à titrer selon l'hypothèse faite sur l'activité de l'échantillon par rapport à celle de l'étalon. Le rapport des deux doses est de 1 à 3.

Prélèvement et dosage de calcium

Le sang est prélevé sans anticoagulant une heure (± 5 mn) après l'injection de l'hormone soit à l'aorte abdominale, soit par section de la jugulaire.

Le sang est centrifugé rapidement pour éviter l'hémolyse, le dosage de calcium est pratiqué sur le sérum soit par complexométrie, soit par absorption atomique.

Activité relative de l'échantillon et analyse statistique

Suivant le procédé du Codex 1965 (p 1925 - 42)

Expérience n° 37 770

Titrage de la TCT. KG 12001 lot n°489 (9 MRC/mg), par rapport à l'étalon K 489017 B (68 MRC/mg).

Résultats et analyse statistique

Calcium sérique mg p.cent					
T mU MRC/rat	Etalon			Echantillon	
	0	7	21	7	21
	10,00	9,40	8,10	8,85	8,20
	9,80	8,95	7,40	9,55	8,20
	10,60	8,95	8,20	10,05	8,20
	9,60	9,85	8,55	9,45	8,20
	10,15	9,15	7,75	10,05	8,20
Moyenne	10,09	9,26	8,00	9,59	8,20
	$\pm 0,14$	$\pm 0,16$	$\pm 0,19$	$\pm 0,22$	$\pm 0,00$

Validité du dosage

Les conditions suivantes doivent être remplies :

- 1) Différence étalon dosage : $T_a \leq t_a \Sigma R$
 $(3,25) \quad (3,31) \quad \text{valable}$
- 2) Pente combinée : $T_b > t_b \Sigma R$
 $(13,25) \quad (3,31) \quad \text{valable}$
- 3) Parallélisme des courbes : $T_{ab} < t_{ab} \Sigma R$
 $(0,65) \quad (3,31) \quad \text{valable}$

Pente et index de précision

$$\text{Pente} \quad b = \frac{T_b^*}{2 \text{ i n}} \quad \text{Pour deux doses}$$

$$b = -2,77 \quad (-b) \text{ doit être } \geq 2$$

$$\text{Index de précision} \quad \lambda = \frac{\sqrt{s^2}}{b}$$

$$\lambda = 0,13 \quad \text{doit être } \leq 0,3$$

Calcul de l'activité relative et limites de confiance

$M' = -0,0954$ dont l'antilog = 0,823 (82,3 p.cent)

L'activité de l'échantillon est donc 82,3 p.cent de celles de l'étalon.

Le titre en MRC de l'échantillon est 7,40 MRC/mg

Limites de confiance de l'activité relative :

et $0,573$ (57,3 p.cent) soit 5,15 MRC/mg
 $1,085$ (108,5 p.cent) soit 9,76 MRC/mg

B I B L I O G R A P H I E

- ALDRED, J.P., CLEMENTS, G.R., SCHLUETER, R.J., BASTIAN, J.W., DAILEY, J.P. et WAZETER, F.X.
Pharmacologic and Toxicologic effects of Porcine thyrocalcitonin in animals.
TAYLOR, S. (Ed.), Calcitonin : Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and the C cells. London : Heinemann 1968, 373-378.
- AMER, S.
An improved assay of parathyroid hormone.
Endocrinology, 1968, 82, 166-170
- A.O.A.C.
Official and Tentative methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 1945, 6ème édition, 625-626.
- ARDAILLOU, R., VUAGNAT, P., MILHAUD, G., RICHET, G.
Effet de la thyrocalcitonine sur l'excrétion rénale du phosphore, du calcium et des ions H^+ chez l'homme normal.
J. Physiol., 1967, 59, Suppl. 1, 204
- ARNAUD, C.D., TENENHOUSE, A.M. et RASMUSSEN, H.
Parathyroid Hormone
Ann. Rev. Physiol., 1967, 29, 349-372
- AU W.Y.W. and RAISZ, L.G.
Restoration of Parathyroid responsiveness in vitamin D deficient rats by parental calcium or dietary lactose.
J. Clin. Invest., 1967, 46, 1572-1578
- AURBACH, G.D.
Isolation of parathyroid hormone after extraction with phenol.
J. Biol. Chem., 1959, 234, 3179-3181
- AVIOLI, L.V., BIRGE, S.J., SCOTT, S. and SHIEBER, W.
Role of thyroid gland during glucagon induced hypocalcemia in the dog.
Amer. J. Physiol., 1969, 216, 939-945

- AYMARD, P.
Thèse, Faculté de Pharmacie, Paris 1970
- BAGHDIA NTZ, A., FOSTER, G. V., EDWARDS, S., KUMAR, M. A., SLACK, E., SOLIMAN, H. A. and Mac INTYRE, I.
Extraction and purification of calcitonin.
Nature, London, 1964, 203, 1027-1028
- BELANGER, L. F. and MIGICOVSKY, B. B.
Early changes at the epiphysis of rachitic chicks, following administration of vitamin D.
J. Exptl. Med., 1958, 107, 821-828
- BELL, P. H., BARG, W. F. Jr., COLUCCI, D. F., DAVIES, M. C., DZIOBKOWSKI, C., ENGLERT, M. E., HEYDER, E., PAUL, R. and SNEDEKER, E. H.
Purification and structure of porcine calcitonin. I-
J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 2704-2706
- BIERING, A.
Bioassay of parathyroid Hormone on rats.
Acta pharmacol., Kbh., 1950, 6, 40-58, 59-73
- BLISS, C. I.
The statistics of Bio-assay.
Academic Press, 1952, pp. 493-496, 576-582
- BORLE, A. B.
Le turn-over du calcium dans l'organisme et les principaux points d'impact hormonaux.
Problèmes actuels d'endocrinologie et de nutrition, série n°15. Les hormones et le calcium.
L'Expansion, 1971, pp. 5-34
- BREWER, H. B. and RONAN, R.
Bovine parathyroid hormone : amino-acid sequence.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash), 1970, 67, 1862-1869
- BROWN, D. M., PEREY, D. Y. E., DENT, P. B. and GOOD, R. A.
Effect of chronic calcitonin deficiency on the skeleton of the chicken.
Proc. Soc. exp. B. and M., 1969, 130, 1001-1004

- CANAS, F.M., BERGSTROM, W.H. and CHURGIN, S.J.
Effects of the adrenal on calcium homeostasis in the rat.
Metab.Clin.Exptl., 1967, 16, 670-675
- CARE, A.D., COOPER, C.W., DUNCAN, T. and ORIMO, H.
The direct measurement of thyrocalcitonin secretion rate in vivo.
TALMAGE, R.V., BELANGER, L.F. ed., Parathyroid hormone and thyrocalcitonin (Calcitonin).
Excerpta Med.Found., Amsterdam, 1968, pp.417-427
- CARRUTHERS, B.M., COPP, D.H. and Mac INTOSH, H.W.
Diurnal variation in urinary excretion of calcium and phosphate and its relation to blood levels.
J.Lab.Clin.Med., 1964, 63, 959-968
- CAUSERET, J. et HUGOT, D.
Effet de la vitamine D sur la calcémie du jeune rat carencé en calcium et sur le développement de diverses parties de son squelette.
Bull.Soc.Chim.Biol., 1959, 41, 843-853
- CAUSTON, A., CHORLTON, B. and ROSE, G.A.
An improved assay for parathyroid hormone, observing the rise of serum calcium in thyroparathyroidectomized rats.
J.Endocrinology, 1965, 33, 1-12
- CHASE, L.R. and AURBACH, G.D.
Parathyroid function and the renal excretion of 3',5' adenylic acid.
Proc.nat.Acad.Sci. U.S.A., 1967, 58, 518-525
- CHAUSMER, A., MITTLEMAN, R. and WALLACH S.
Studies of thyrocalcitonin action
Endocrinology, 1966, 79, 131-137
- CLAVERT, J. et BENOIT, J.
Rétention du calcium alimentaire déterminée chez le pigeon par le dipropionate d'oestradiol.
Bull.Soc.Chim.Biol., Paris, 1942, 24, 1469-1474
- Codex Français
Méthodes statistiques
Pharmacopée Française, 1965, VIIIème édition, pp.1625-1642

- COLLIP, J.B.

The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium.

J.Biol.Chem., 1925, 63, 395-438

- COLLIP, J.B. and CLARK, E.P.

Further studies on the physiological action of a parathyroid hormone.

J.Biol.Chem., 1925, 64, 485-507

- COPP, D.H.

The ultimobranchial glands and calcium regulation.

HOAR, W.S., RANDALL, D.J. ed., in Fish Physiology, 1969, 2, 377-98, Academic Press, New York.

- COPP, D.H.

Endocrine regulation of calcium metabolism.

Ann.Rev.Physiol., 1970, 32, 61-86

- COPP, D.H., CAMERON, E.C.

Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract.

Science, 1961, 134, 2038-2039

- COPP, D.H., CAMERON, E.C., CHENEY, B.A., DAVIDSON, A.G.F. and HENZE, K.G.

Evidence for calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium.

Endocrinology, 1962, 70, 638-649

- COPP, D.H., COCKCROFT, D.W. and KUEH, Y.

Calcitonin from ultimobranchial glands of dogfish and chickens.

Science, 1967, 158, 924-925

- COPP, D.H. and KUCZERPA, A.V.

A new bioassay for calcitonin and effect of age and dietary Ca on the response.

TAYLOR S. (ed.) Calcitonin : Proceedings of the symposium on thyrocalcitonin and C.cells.

Heinemann, London, 1968, 18-24

- COPP, D.H. and PARKES, C.O.

Extraction of calcitonin from ultimobranchial tissue.

TALMAGE, R.V., BELANGER, L.F. ed., Parathyroid hormone and thyrocalcitonin (Calcitonin).

Excerpta Med.Found., Amsterdam, 1968, pp.74-84

- COOPER, C.W.

Strain differences in thyrocalcitonin content of rat thyroid glands, associated with differences in sensitivity to thyrocalcitonin.

Endocrinology, 1968, 82, 1015-1020

- DAVIES, B.M.A., GORDON, A.H. and MUSSETT, M.V.

A plasma calcium assay for parathyroid hormone using parathyroidectomized rats.

J. Physiol., London, 1954, 125, 383-395

- DeLUCA, H.F.

Mechanism of action and metabolic fate of vitamin D

Vitamins and Hormones, 1967, 25, 315-367

- DeLUCA, H.F.

Recent advances in the metabolism and function of vitamin D.

Fed. Proceed., 1969, 28, 1678-1689

- FRIEDMAN J. and RAISZ, L.G.

Thyrocalcitonin inhibitor of bone resorption in tissue culture.

Science, 1965, 150, 1465-1466

- GADDUM, J.H.

Bioassays and Mathematics

Pharmacol. Rev., 1953, 5, 87-134

- GAILLARD, P.J.

Bone culture studies with calcitonin. Fourth European Symposium on Calcified Tissues, GAILLARD P.J. ed.

Excerpta Medica Foundation, 1966, pp. 32-33

- GAREL, J.M.

Dosage biologique de la parathormone chez le jeune rat de trois jours.

C.R. Acad. Sci., Paris, 1969, 268, 2932-2933

- GAUTIER, J.A. et PIGNARD, P.

Nouvelles méthodes pour le dosage du calcium dans le sérum sanguin et les liquides de l'organisme.

Ann. Pharm. Fr., 1953, XI, 438-445

- GREEP, R.O. and KENNY, A.D.
Physiology and Chemistry of the parathyroids.
PINCUS, G., THIMANN, K.V., The Hormones, 1955, 3, 153-174
Academic Press, New York
- GUTTMANN, ST., PLESS, J., SANDRIN, Ed., JAQUENOUD, P.-A., BOSSERT, H. et WILLEMS, H.
Synthèse des thyrocalcitonines
Helv. Chim. Acta, 1968, 51, 1155-1158
- HANSON, A.M.
An elementary chemical study of the parathyroid glands of cattle.
Milit. Surg., 1923, 52, 280-284
- HARRISON, H.E.
Parathyroid hormone and vitamin D
Yale J. Biol. Med., 1966, 38, 393-409
- HARRISON, H.E., HARRISON, H.C. and PARK, E.A.
Vitamin D and citrate metabolism. Effect of vitamin D in rats fed diets adequate in both calcium and phosphorus.
Amer. J. Physiol., 1958, 192, 432-436
- HARRISON, H.E. and HARRISON, H.C.
The interaction of vitamin D and parathyroid hormone on calcium phosphorus and magnesium Homeostasis in the rat.
Metabolism, 1964, 13, 952-958
- HARRISON, H.C. and HARRISON, H.E.
Comparaison of activity of 25 hydroxycholecalciferol and dihydrotachysterol in the thyroparathyroidectomized rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1971, 136, 411-414
- HIRSCH, P.F., WOELKEL, E.F. and MUNSON, P.L.
Thyrocalcitonin : hypocalcemic hypophosphatemic principle of the thyroid gland.
Science, 1964, 146, 412-413
- HIRSCH, P.F. and MUNSON, P.L.
Thyrocalcitonin
Physiol. Rev., 1969, 49, 548-622

- HODGES, R.D.

The structure of the fowl's ultimobranchial gland.
Ann.Biol.Anim.Biophys., 1970, 10, (suppl.2), 255-279

- HUBBEL, R.B., MENDEL, L.B. and WAKEMAN, A.J.

A new salt mixture for use in experimental diets.
J.Nut., 1937, 14, 273-285

- HUGUES, J.S., TITUS, R.W. and SMITS, B.L.

The increase in the calcium of hens blood accompanying egg production.
Science, 1927, 65, 264

- HURST, R.O.

The determination of nucleotide phosphorus with a stannous chloride hydrazine sulphate reagent.
Canad.J.Biochem., 1964, 42, 287-292

- KAPLAN, E.L., PESKIN, G.W. and ARNAUD, C.D.

Non-steroid, calcitonin - like factor from the adrenal gland.
Surgery, 1969, 66, 167-174

- KENNY, A.D. and MUNSON, P.L.

A method for the biological assay of phosphaturic activity in parathyroid extracts.
Endocrinology, 1959, 64, 513-521

- KRAINTZ, L. and INTSCHER, K.

Effect of calcitonin on the domestic fowl.
Canad.J.Physiol.Pharmacol., 1969, 47, 313-315

- MABRY, C.C., GEVEDON, R.E., ROECKEL, I.E. and GOCHMAN, N.

Automated submicrochemistries
Am.J.Clin.Pathol., 1966, 46, 265-281

- MARNAY, C. et RAOUL, Y.

Rôle indispensable de la vitamine D pour observer l'action hypercalcémisante de l'hormone parathyroïdienne chez le rat normal.
C.R.Soc.Biol., 1959, 83, 1949-1951

- MARNAY, C., GUERILLOT-VINET, A. et RAOUL, Y.
Présence de la vitamine D dans les parathyroïdes. Conséquences physiologiques.
C.R.Acad.Sci., Paris, 1964, 258, 3765-3768
- MARNAY-GULAT, C., NGHIEM, T. et RAOUL, Y.
Surrénales et interrelations endocriniennes dans le contrôle de la calcémie.
Les Tissus calcifiés, 5ème Symposium européen, 1968, pp.207-211.
- MARTIN, T.
Thesis, University of Rochester, 1958
- MARTIN, T.J., ROBINSON, C.J. and Mac INTYRE, I.
The mode of action of thyrocalcitonin.
Lancet, 1966, i, pp.900-902
- MILHAUD, G.
La thyrocalcitonine. La thyroïde.
L'Expansion, 1969, pp.179-198
- MILHAUD, G.
Action de la parathormone sur l'os.
Problèmes actuels d'endocrinologie et de nutrition, série n°15.
Les hormones et le calcium.
L'Expansion, 1971, pp.117-136
- MILHAUD, G. et MOUKHTAR, M.S.
Hypophysectomie et thyrocalcitonine.
C.R.Acad.Sci., Paris, 1965, 260, 3179-3182
- MILHAUD, G., PERAULT, A.M. et MOUKHTAR, M.S.
Etude du mécanisme de l'action hypocalcémiante de la thyrocalcitonine.
C.R.Acad.Sci., Paris, 1965, 261, 813-816
- MILHAUD, G., PERAULT-STAU, A.M. et MOUKHTAR, M.S.
Thyrocalcitonine : effet de l'âge sur l'hypocalcémie et l'hyperphosphatémie.
C.R.Acad.Sci., Paris, 1967, 264, 110-113
- MILHAUD, G., TSIEN MING, Li et MOUKHTAR, S.
Synergie et antagonisme de la thyroxine, de la parathormone et de la thyrocalcitonine sur la calcémie et la phosphatémie.
C.R.Acad.Sci., Paris, 1967, 264, 846-849

- MORGAN, A.F. and GARRISON, E.A.

The effect of vitamin D and of reaction of diet upon response to parathyroid extract.

J. Biol. Chem., 1930, 85, 687-711

- MORII, H. et De LUCA, H.F.

Relationship between vitamin D deficiency. Thyrocalcitonin and parathyroid hormone.

Amer. J. Physiol., 1967, 213, 358-361

- MUNSON, P.L.

Studies on the role of the parathyroids glands in calcium and phosphorus metabolism.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1955, 60, 776-796

- MUNSON, P.L.

Biological assay of parathyroid hormone.
In the Parathyroids.

GREEP, R.O. and TALMAGE, R.V. (Ed.). Springfield : Charles, C. THOMAS, 1961, pp. 94-113

- MUNSON, P.L. and HIRSCH, P.F.

Thyrocalcitonin : Newly Recognized Thyroid hormone concerned with metabolism of bone.

Clin. Orthoped., 1966, 49, 209-232

- NEHER, R., RINIKER, B., ZUBER, H., RITTEL, W. and KAHNT, F.W.

Thyrocalcitonin. II. Struktur von alpha-thyrocalcitonin.

Helv. chim. Acta., 1968, 51, 916-924

- NIALL, H.D., KEUTMANN, H.T., SAUER, R., HOGAN, M., DAWSON, B.F., AURBACH, G.D. and POTTS, J.T.

The amino-acid sequence of bovine parathyroid hormone I.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1970, 351, 1586-1588

- NICHOLS, G., SCHATUM, S. and VAES, G.M.

Some effects of vitamine D and parathyroid hormone on the calcium and phosphorus metabolism of bone in vitro.

Acta Physiol. Scand., 1963, 57, 51-60

- NICOLAYSEN, R. and EEG. LARSEN, N.
The biochemistry and physiology of vitamin D.
Vitam. and Hormon., 1953, 11, 29-60
- PANOS, T. C., KLEIN, G. F. and FINERTY, J. C.
Effect of fat deficiency on pituitary-gonad relationships.
J. Nutr., 1959, 10, 509-540
- PARSONS, J. S.
Effects of added protein on apparent potency of thyrocalcitonin.
TAYLOR S. (ed.) Calcitonin : Proceedings of the symposium on thyrocalcitonin and the C cells.
Heinemann, London, 1968, 36-44
- PARSONS, J. A. and WOODWARD, P. M.
Rapport on collaborative bioassay of four preparations of porcine thyrocalcitonin in seven laboratories.
TAYLOR, S. (ed) Calcitonin : Proceedings of the symposium on thyrocalcitonin and the C cells.
Heinemann, London, 1968, 42-50.
- PHILIPPE, J.
Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie.
Masson, 1967, pp. 162-264
- PHILLIPPO, M. and HINDE, F.
Age and sex as factors in the response to thyrocalcitonin.
TAYLOR (ed.) Calcitonin proceedings of the symposium on thyrocalcitonin and the C cells.
Heinemann, London, 1968, 25-31
- POLIN, D., STURKIE, P. D. and HUNSACKER, W.
The blood calcium response of the chicken to parathyroid extracts.
Endocrinology, 1957, 60, 1-5
- POTTS, J. T. Jr., BUCKLE, R. M., SHERWOOD, L. M., RAMBERG, C. F. Jr., MAYER, G. P., KRONFELD, D. S., DEFTOS, L. J., CARE, A. D. and AURBACH, G. D.
Control of secretion of parathyroid hormone.
TALMAGE, R. V., BELANGER, L. F. ed., Parathyroid hormone and thyrocalcitonin. Calcitonin.
Excerpta Med. Found., Amsterdam., 1968 (a), 407-416

- POTTS, J.T.Jr., NIALL, H.D., KEUTMANN, H.T., BREWER, H.B.Jr. and DEFTOS, L.J.
The amino acid sequence of porcine thyrocalcitonin.
Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A., 1968 (b), 59, 1321-1326

- POTTS, J.T., TREGGAR, G.W., KEUTMANN, H.T., NIALL, H.D., SAUER, R., DEFTOS, L.J.
DAWSON, B.F., HOGAN, M. and AURBACH, G.D.
Synthesis of biologically active N-terminal tetratriacontapeptide of
parathyroid hormone.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 1971, 68, 63-67

- PRELOT, M., DURAND, D. et BELDON, H.
Effets chroniques des hormones somatotrope, thyroéotrope et de la thy-
roxine sur le métabolisme phosphocalcique de la rate normale et thyro-
parathyroïdectomisée.
J.Physiol., 1971, 63, 705-713

- PRELOT M., GUERILLOT-VINET, A. et BAZIER, R.
Etude de l'action antirachitique de la cétone 250 et de sa forme éno-
lique comparée à celle de la vitamine D₃ chez le poulet et le rat.
Arch.Sci.Physiol., 1958, XII, 45-58

- RASMUSSEN, H. and WESTALL, R.G.
The partial purification of parathyroid hormone by means of ultra-
filtration and displacement chromatography.
Biochem.J., 1957, 67, 658-663

- RASMUSSEN, H. and CRAIG, L.C.
Purification of parathyroid hormone by counter-current distribution.
J.Am.Chem.Soc., 1959, 81, 5003

- RASMUSSEN, H., De LUCA, H.E., ARNAUD, C., HAWKER, C. and Von STEDINGK, M.
The relationship between vitamin D and parathyroid hormone.
J.Clin.Invest., 1963, 42, 1940-1946

- RASMUSSEN, H. and TENENHOUSE, A.
Parathyroid Hormone and Calcitonin.
Biochemical Actions of Hormones.
LITWACK, G. (ed), Academic Press, New York and London, 1970, 1, 365-413

- REYNOLDS, J.J., DINGLE, J.T., GUDMUNDSSON, T.V.
Bone resorption in vitro and its inhibition by calcitonin.
TAYLOR (ed) Calcitonin : Proceedings of the symposium on thyrocalci-
tonin and the C cells.
Heinemann, London, 1968, pp. 223-229

- RITTEL, W., BRUGGER, M. KAMBER, B., RINIKER, B. and SIEBER, P.
Thyrocalcitonin. III Die Synthese des alpha-thyrocalcitonin.
Helv. Chim. Acta, 1968, 51, 924-928
- ROUSSELET, F.
Thèse Doct. Pharmacie, Paris 1966
- SANDERSON, P. H., MARSHALL, F., III and WILSON, R. E.
Calcium and phosphorus homeostasis in the parathyroidectomized dog :
evaluation by means of ethylenediaminetetraacetate and calcium tolerance
tests.
J. Clin. Invest., 1960, 39, 662-670
- SERENSEN, O. H., HELLESEN, C. and HINDBERG, I.
The effect of diet and age on the response to calcitonin in rats.
Acta endocrinologica, 1970, 65, 316-322
- STEENBOCK, H. and HERTING, D. C.
Vitamin D and growth.
J. Nutr., 1955, 10, 449-468
- STURTRIDGE, W. C. and KUMAR, M. A.
An improved bioassay for calcitonin.
J. Endocrinol., 1968, 42, 501-503
- TALMAGE, R. V., COOPER, C. W. and PARK, H. Z.
Regulation of calcium transport in bone by parathyroid hormone.
Vit. and Horm., Academic Press, New York and London, 1970, 28, 103-140
- TALMAGE, R. V. and KENNEDY, J. W.
Parathyroid hormone and thyrocalcitonin function in adrenalectomized
rats.
Endocrinology, 1970, 86, 1075-1080
- TALMAGE, R. V., PARK, H. Z. and WEBSTER, J.
Parathyroid hormone and thyrocalcitonin function in cortisol-treated rats
Endocrinology, 1970, 86, 1080-1084
- TAYLOR, T. G. and STRINGER, D. A.
Eggshell formation et skeletal metabolism
Avian physiology, Second edition
CORNELL University Press, 1965, pp. 485-514

- THORP, R.H.
Parathyroid hormone
Methods in Hormone research.
DORFMAN, R.I. (ed.), A.P. New York and London, 1962, II, 477-493
- TOVERUD, S.U.
The effect of parathyroid hormone and vitamin D on serum calcium in rats
Acta Physiol. Scand., 1964, 62, 391-406
- WALDROUP, P.W., AMMERMAN, C.B. and HARMS, R.H.
The utilisation by the chick of calcium from different sources.
Poultry Sci., 1964, 43, 212-216
- WASSERMAN, R.H. and TAYLOR, A.N.
Vitamin D₃ inhibition of radiocalcium binding by chick intestinal homogenate.
Nature, London, 1963, 198, 30-32
- WASSERMAN, R.H. and TAYLOR, A.N.
Vitamin D₃ induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa.
Science, 1966, 152, 791-793
- WASSERMAN, R.H., TAYLOR, A.N., CORRADINO, R.A. and KALFELZ, F.A.
Intestinal calcium absorption, vitamin D and a mucosal calcium binding protein.
In : Les tissus calcifiés, Vè symposium européen.
SEDES, Paris, 1968, pp. 253-271
- WESSON, Y.G.
A modification of the Osborne-Mendel salt mixture containing only inorganic constituents.
Science, 1932, 75, 339-440
- WOODHEAD, J.S., O'RIORDAN, J.L.H., KEUTMANN, H.T., STOLTZ, M.L., DAWSON, B.F., NIALL, H.D., ROBINSON, C.J. and POTTS, J.T.
Isolation and chemical properties of porcine parathyroid hormone.
Biochemistry, 1971, 10, 2787-2792

